

Université de Montréal

**Le rôle de l'expression de nétrine-1 par les cellules
présentatrices d'antigènes dans la régulation immunitaire
et la sclérose en plaques**

Par Jean-Philippe Ouimet, MD
Département de Neurosciences
Faculté de Médecine

Mémoire présenté à la Faculté des Études Supérieures
en vue de l'obtention du grade de M.Sc. en Neurosciences

Décembre 2018

©Jean-Philippe Ouimet, 2018

Résumé

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du système nerveux central (SNC) caractérisée par de l'infiltration leucocytaire et de la démyélinisation axonale. Les cellules présentatrices d'antigènes (APC) jouent un rôle primordial dans ce processus en activant dans la périphérie les lymphocytes T réactifs contre la myéline. Les lymphocytes activés peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) et infiltrer le SNC. Les lymphocytes sont ensuite réactivés dans l'espace périvasculaire par les APC, suite à quoi ils contribuent à la démyélinisation et aux dommages axonaux. Nétrine-1 (N1) est une protéine de guidance axonale possédant d'importantes propriétés anti-inflammatoires. L'importance de N1 dans le maintien de la BHE et l'inhibition de l'infiltration leucocytaire dans le SNC a été bien démontrée, mais son implication dans la présentation antigénique et la régulation de l'activation lymphocytaire n'a jamais été étudiée. Le présent ouvrage propose l'hypothèse que N1 est produite par les APC afin de réguler la neuro-inflammation. Il cherche à caractériser l'expression de N1 par les APC, déterminer l'influence de N1 sur l'activation lymphocytaire et explorer le rôle de la production de N1 par les APC dans la neuro-inflammation. Les expériences menées à terme dans le cadre de ce projet démontrent que N1 est exprimée par les cellules dendritiques matures et les macrophages de type M1. De plus, N1 a pour effet de stimuler la prolifération des lymphocytes TH1, TH17 et CD8+. N1 inhibe également la production de cytokines par les lymphocytes TH17 et diminue l'expression de perforine par les lymphocytes T CD8+. N1 n'a toutefois pas d'influence sur l'expression des molécules d'adhérence par les lymphocytes T. Enfin, les cellules dendritiques, macrophages et cellules microgliales n'expriment pas N1 dans le SNC des souris dans le cadre de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale, un modèle animal de SEP. En somme, les résultats ici présentés suggèrent que N1 est produite par les APC afin d'influencer le fonctionnement des lymphocytes T.

Mots-clés : Nétrine-1, Cellules Présentatrices d'Antigènes, Cellules Dendritiques, Macrophages, Lymphocytes T CD4+, Lymphocytes T CD8+, Sclérose en Plaques, Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale.

Abstract

Multiple Sclerosis (MS) is an autoimmune disorder of the central nervous system (CNS) characterized by leukocytic infiltration and axonal demyelination. Antigen presenting cells (APCs) play a crucial role in this process by activating myelin-reactive lymphocytes in the periphery. Activated lymphocytes subsequently cross the blood-brain barrier (BBB) and infiltrate the CNS. These lymphocytes are reactivated in the perivascular space by APCs, following which they contribute to demyelination and axonal damage. Netrin-1 (N1) is an axonal guidance protein with considerable anti-inflammatory properties. The relevance of N1 in maintaining BBB function has been thoroughly established, but its involvement in antigen presentation and T cell activation has yet to be studied. This project investigates the hypothesis that N1 is produced by APCs to regulate neuroinflammation and aims to characterize N1 production by APCs, delineate the impact of N1 on T cell activation and clarify the role of APC-derived N1 in neuroinflammation. The results presented in this thesis demonstrate that N1 is produced by mature dendritic cells and M1 macrophages. Furthermore, N1 is shown to increase T cell proliferation, decrease TH17 cell cytokine production and decrease CD8⁺ T cell perforin expression. N1 does not alter T cell expression of adhesion molecules. Finally, N1 is not expressed by the CNS dendritic cells, macrophages or microglial cells of mice undergoing experimental autoimmune encephalomyelitis, an animal model for MS. In summary, these results suggest that N1 is produced by APCs to modulate T cell function.

Keywords : Netrin-1, Antigen Presenting Cells, Dendritic Cells, Macrophages, CD4⁺ T Cells, CD8⁺ T Cells, Multiple Sclerosis, Experimental Autoimmune Encephalomyelitis.

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Table des matières	iv
Liste des abréviations	vii
Liste des figures	ix
Liste des tableaux.....	xi
Remerciements	xii
1. Introduction.....	1
1.1 Le Système Immunitaire	1
1.1.1 Réponse Immunitaire Innée	1
1.1.1.1 Réponse Immunitaire Précoce	1
1.1.1.2 Neutrophiles	2
1.1.1.3 Monocytes et Macrophages dans la Réponse Immunitaire Innée	3
1.1.2 Cellules Présentatrices d'Antigènes et Présentation Antigénique .	4
1.1.2.1 Physiologie de la Présentation Antigénique	4
1.1.2.2 Les Cellules Dendritiques.....	5
1.1.2.3 Les Macrophages	8
1.1.2.4 Les Lymphocytes B	9
1.1.2.5 La Microglie	10
1.1.3 Immunité Adaptative	11
1.1.3.1 Activation des Lymphocytes T.....	11
1.1.3.2 Lymphocytes T CD4+	11
1.1.3.3 Lymphocytes T CD8+	13
1.2 La Sclérose en Plaques	13
1.2.1 Généralités.....	13
1.2.1.1 Épidémiologie.....	13

1.2.1.2 Pathologie	14
1.2.2 Rôle des Cellules Présentatrices d'Antigènes en Sclérose en Plaques	15
1.2.2.1 Cellules Dendritiques	16
1.2.2.2 Macrophages et la Microglie.....	18
1.2.3 Lymphocytes T en Sclérose en Plaques	20
1.2.3.1 Auto-Réactivité contre les Antigènes de Myéline des Lymphocytes T	20
1.2.3.2 Migration des Lymphocytes T à Travers la Barrière Hémo-Encéphalique	21
1.2.3.3 Fonctions Effectrices des Lymphocytes T CD4+	22
1.2.3.4 Fonctions Effectrices des Lymphocytes T CD8+	24
1.3 Nétrine-1	25
1.3.1 Nétrine-1 et ses Récepteurs	25
1.3.1.1 Structure de Nétrine-1	25
1.3.1.2 Rôles Physiologiques de Nétrine-1	28
1.3.1.3 Récepteurs de Nétrine-1	29
1.3.2 Rôles de Nétrine-1 dans l'Inflammation	30
1.3.2.1 L'influence de l'Axe Nétrine-1 sur le Système Immunitaire	30
1.3.2.2 L'Influence de l'Axe Nétrine-1 sur l'Inflammation Périphérique	31
1.3.2.3 L'Influence de l'Axe Nétrine-1 dans la Neuroinflammation	32
2. Hypothèse et Objectifs.....	34
3. Matériel et Méthodes	35
3.1 Isolation des Cellules Mononucléées Sanguines Périphériques	35
3.2 Isolation des Monocytes et Lymphocytes	35
3.3 Différentiation des Cellules Dendritiques	36
3.4 Différentiation des Macrophages M1 et M2	38

3.5 La Réaction en Chaîne par Polymérase Quantitative (qPCR)	38
3.5 Immunobuvardage	40
3.6 Marquage Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester (CFSE)	42
3.7 Activation et Polarisation Lymphocytaire	42
3.8 Marquage Cellulaire et Cytométrie de Flux	43
3.8 Immunohistochimie	45
4. Résultats	48
4.1 Les cellules dendritiques augmentent leur expression de Nétrine-1 suite à leur maturation	48
4.2 Les macrophages M1 expriment Nétrine-1 mais pas les M2	56
4.3 Nétrine-1 augmente la prolifération des lymphocytes T CD4+	60
4.4 Nétrine-1 diminue sélectivement l'expression de cytokines par les lymphocytes TH17	70
4.5 Nétrine-1 n'influence pas l'expression de molécules d'adhérence par les lymphocytes T CD4+	75
4.6 Nétrine-1 augmente la prolifération des lymphocytes T CD8+	78
4.7 Nétrine-1 diminue l'expression d'IL-17 et de perforine par les lymphocytes T CD8+	81
4.8 Nétrine-1 n'influence pas l'expression de molécules d'adhérence par les lymphocytes T CD8+	92
4.9 Nétrine-1 n'est pas exprimée par les cellules présentatrices d'antigènes du système nerveux central durant l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale	96
5. Discussion	106
5.1 Validité Technique des Résultats	106
5.2 Implications Scientifiques des Résultats	111
5.3 Implications Thérapeutiques	115
5.4 Orientation Future	118
6. Conclusion	121
Références	122

Liste des Abréviations

Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule - ALCAM
Barrière Hémo-Encéphalique – BHE
Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester - CFSE
Complexe Majeur d’Histocompatibilité - CMH
Cellules Dendritiques/*Dendritic Cells* – DC
Cellules Dendritiques Conventionnelles type 1/*Conventional Dendritic Cells type 1* – cDC1
Cellules Dendritiques Conventionnelles type 2/*Conventional Dendritic Cells type 2* – cDC2
Cellules Dendritiques Dérivées de Monocytes/*Monocyte-Derived Dendritic Cells* – moDC
Cellules Dendritiques Immatures – iDC
Cellules Dendritiques Matures - mDC
Cellules Mononucléées Sanguines Périphériques/*Peripheral Blood Mononuclear Cells* - PBMC
Cellules Présentatrices d’Antigènes/*Antigen Presenting Cells* – APC
C-type Lectin Receptors - CLR
Damage-Associated Molecular Patterns - DAMP
Deleted in Colorectal Cancer - DCC
Dendritic Cell-Specific Intercellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin – DC-SIGN
Encéphalomyélite Auto-Immune Expérimentale - EAE
Granulocyte-Macrophage Colony-Stimulating Factor – GM-CSF
Interféron-gamma - IFN- γ
Interleukine-1 - IL-1
Lipopolysaccharides – LPS
Liquide Céphalo-Rachidien - LCR

Macrophage Colony-Stimulating Factor – M-CSF
Macrophages/Microglie – M/M
Matrice Métalloprotéase-9 – MMP-9
Melanoma Cell Adhesion Molecule – MCAM
Molécules d'adhérence Cellulaire/*Cell Adhesion Molecules* – CAM
Myelin Basic Protein – MBP
Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein - MOG
Nétrine-1 - N1
Nétrine-1 Clivée/*Cleaved Netrin-1* – cN1
NOD-like Receptors – NLR
Oxyde d'Azote/*Nitric Oxide* – NO
Oxyde d'Azote Synthétase Inductible - iNOS
Pathogen-Associated Molecular Patterns – PAMP
Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule - PECAM
Proteolipid Protein – PLP
Regulatory T Cell - Treg
RIG-I-like Receptors - RLR
Sclérose en Plaques – SEP
Sonic Hedgehog – Shh
Système Nerveux Central – SNC
T Cell Receptors – TCR
T Helper Cell 1 – TH1
T Helper Cell 2 – TH2
T Helper Cell 17 – TH17
Toll-like Receptors – TLR
Tumor Necrosis Factor alpha – TNF- α
Vascular Cell Adhesion Molecule-1 – VCAM-1

Liste des figures

Figure 1. Structure de Nétrine-1 et de ses récepteurs.....	26
Figure 2. Protocole de différenciation des cellules dendritiques.....	49
Figure 3. Les monocytes se différencient en cellules dendritiques immatures au jour 5 et acquièrent un phénotype mature après la stimulation par LPS au jour 7.	51
Figure 4. Les cellules dendritiques augmentent de façon significative leur expression d'ARN pour Nétrine-1 lors de la maturation.....	53
Figure 5. Les cellules dendritiques augmentent de façon significative leur expression de la protéine Nétrine-1 lors de leur maturation	54
Figure 6. Protocole de différenciation des macrophages M1 et M2	57
Figure 7. Les macrophages générés expriment un phénotype M1 ou M2 suite à la différenciation	58
Figure 8. Les macrophages M1 expriment l'ARN pour Nétrine-1, mais pas les macrophages M2.....	61
Figure 9. Les macrophages M1 expriment la protéine Nétrine-1, mais pas les macrophages M2.....	62
Figure 10. Protocole d'activation et de polarisation des lymphocytes T CD4+	64
Figure 11. Le marquage CFSE est optimal aux jours 4 et 5 pour les lymphocytes T CD4	65
Figure 12. Stratégie de sélection des lymphocyte T CD4+ prolifératifs par marquage CFSE	67
Figure 13. Nétrine-1 augmente la prolifération des lymphocytes TH1 à jour 5	68
Figure 14. Nétrine-1 augmente la prolifération des lymphocytes TH17 à jour 5	69
Figure 15. Stratégie de sélection des lymphocytes T CD4+ pour la mesure de l'expression des cytokines	71
Figure 16. Nétrine-1 n'influence pas la production de cytokines par les lymphocytes TH1.....	73
Figure 17. Nétrine-1 diminue la production d'interféron- γ et d'IL-17 par les lymphocytes TH17.....	74

Figure 18. Stratégie de sélection des lymphocytes T CD4+ pour la mesure de l'expression des molécules d'adhérence	76
Figure 19. Nétrine-1 n'influence pas l'expression de molécules d'adhérence des lymphocytes TH1.....	79
Figure 20. Nétrine-1 n'influence pas l'expression de molécules d'adhérence des lymphocytes TH17.....	80
Figure 21. Protocole d'activation des lymphocytes T CD8+	82
Figure 22. Le marquages CFSE est optimal aux jours 3 et 4 pour les lymphocytes T CD8+	83
Figure 23. Stratégie de sélection des lymphocyte T CD8+ prolifératifs par marquage CFSE.....	85
Figure 24. Nétrine-1 augmente la prolifération des lymphocytes T CD8+ activés	86
Figure 25. Stratégie de sélection des lymphocytes T CD8+ pour la mesure de l'expression des cytokines, granzyme B et perforine.....	88
Figure 26. Nétrine-1 diminue la production d'IL-17 par les lymphocytes T CD8+ activés	90
Figure 27. Nétrine-1 diminue la production de perforine mais pas de granzyme B par les lymphocytes T CD8+ activés	91
Figure 28. Stratégie de sélection des lymphocytes T CD8+ pour la mesure de l'expression des molécules d'adhérence.....	93
Figure 29. Nétrine-1 n'influence pas l'expression de molécules d'adhérence des lymphocytes T CD8+ activés	95
Figure 30. Nétrine-1 n'est pas exprimée par les cellules dendritiques dans le cerveau lors de l'EAE	97
Figure 31. Nétrine-1 n'est pas exprimée par les cellules dendritiques dans la moelle épinière lors de l'EAE	99
Figure 32. Nétrine-1 n'est pas exprimée par les macrophages dans le cerveau lors de l'EAE	102
Figure 33. Nétrine-1 n'est pas exprimée par les macrophages dans la moelle épinière lors de l'EAE	104
Figure 34. Résumé des résultats.....	120

Liste des tableaux

Tableau 1. Expression de Nétrine-1 et de ses Récepteurs par les Cellules Endothéliales Cérébrales (BECs) et les Leucocytes	31
Tableau 2. Conditions de Polarisation des Lymphocytes T CD4+	43
Tableau 3. Anticorps pour le Marquage Extracellulaire	45
Tableau 4. Anticorps pour le Marquage Intracellulaire	46
Tableau 5. Isotypes pour la Cytométrie de Flux	46

Remerciements

Par la présente, je tiens à remercier :

Marc Charabati, pour l'aide substantielle apportée quant à la direction et la conception du projet, la rédaction de demandes de bourses, présentations, affiches ou autres documents de nature scientifique et l'apprentissage des techniques de cytométrie et de culture cellulaire.

Stephanie Zandee, pour l'enseignement des techniques de marquage par immunofluorescence et de microscopie confocale et son apport considérable à l'optimisation des marquages par immunofluorescence.

Elizabeth Gowing, pour l'enseignement des techniques de qPCR et d'immunobuvardage.

Lyne Bourbonnière, pour l'administration du laboratoire et son support en lien aux aspects techniques et logistiques du projet.

Dr Alexandre Prat, pour m'avoir offert l'opportunité d'apprendre dans son laboratoire ainsi que la supervision nécessaire pour mener le présent projet à terme.

1. Introduction

1.1 Le Système Immunitaire

1.1.1 Réponse Immunitaire Innée

1.1.1.1 Réponse Immunitaire Précoce

La réponse immunitaire constitue la réaction coordonnée de l'ensemble des tissus, cellules et molécules qui opposent conjointement les germes pathogènes ou les dommages tissulaire. Dans un contexte physiologique, le début de cette réponse est médié par le système immunitaire inné. Lorsqu'un pathogène envahit un tissu particulier, ou qu'un dommage tissulaire est infligé suite à un trauma, une ischémie ou autre, ces derniers sont initialement détectés par les macrophages résidents [1]. Les macrophages résidents sont hétérogènes et peuvent être retrouvés dans la majorité des tissus de l'organisme, où ils exercent un rôle important dans l'homéostasie tissulaire. Ils possèdent des récepteurs contre deux types de signaux : les *pathogen-associated molecular patterns* (PAMP) et les *damage-associated molecular patterns* (DAMP) [2]. Les PAMP sont des molécules présentes chez des bactéries, virus ou autres agents infectieux et incluent des acides nucléiques bactériens ou viraux, des polysaccharides fongiques tel le β -glucane et le α -mannane, la protéine bactérienne flagelline, des fragments de peptidoglycanes formant la paroi cellulaire bactérienne ou les lipopolysaccharides (LPS) qu'on retrouve sur les bactéries Gram-négatives [3]. Les DAMP, quant à eux, sont des molécules endogènes normalement situées à l'intérieur des cellules qui sont libérées suite à des dommages cellulaires. Elles incluent l'ATP, la cytokine IL-1 α , l'acide urique, les protéines plasmatiques S100A8 et S100A9 et la protéine nucléaire HMGB1 [3]. Ces molécules sont reconnues par plusieurs familles de récepteurs incluant les *Toll-like receptors* (TLR), les *C-type lectin receptors* (CLR), les *RIG-I-like receptors* (RLR) et les *NOD-like receptors* (NLR) [4].

Suite à la liaison entre ces molécules et leurs récepteurs, les macrophages résidents vont produire diverses cytokines, notamment interleukine-1 (IL-1) et *tumor necrosis factor alpha* (TNF- α) [5]. Ces cytokines vont influencer les cellules endothéliales des capillaires en induisant l'expression de molécules d'adhérence cellulaire (CAM), favorisant ainsi l'adhésion des leucocytes circulants aux parois de ces

derniers [6, 7]. IL-1 et TNF- α induisent l'expression des CAM P-sélectine et E-sélectine sur les cellules endothéliales [7-9]. Ces dernières se lient aux leucocytes pour les faire rouler le long de la paroi du capillaire [9].

Les leucocytes poursuivent leur infiltration tissulaire grâce à d'autres CAM nommées intégrines. Les intégrines sont exprimées sur les leucocytes et ont, en absence d'inflammation, une faible affinité pour leurs ligands [9]. Lorsque les cellules endothéliales sont activées par des conditions inflammatoires, elles produisent diverses molécules chimio-attractantes nommées chimiokines et les présentent sur leur membrane apicale [10]. Ces chimiokines sont reconnues par les leucocytes, induisant un changement de conformation des intégrines et augmentant ainsi leur affinité pour leurs ligands présents sur les cellules endothéliales [9]. La liaison des intégrines à leurs ligands a pour effet d'arrêter le roulement des leucocytes. Les chimiokines peuvent ensuite exercer leur effet chimiotactique, changeant la conformation du cytosquelette leucocytaire et causant la migration des leucocytes à travers la paroi du capillaire [11].

1.1.1.2 Neutrophiles

Les neutrophiles sont un type de leucocyte polymorphonucléaire qui est caractérisé par un noyau séparé en 2 à 5 segments ainsi que par d'innombrables granules cytoplasmiques [12]. Les neutrophiles représentent le type de leucocyte le plus abondant dans le sang : ils constituent de 50 à 70% de tous les leucocytes circulants [13]. Les neutrophiles représentent la première ligne de défense du système immunitaire. Ils sont les premiers leucocytes à infiltrer les tissus lésés et traverseront les capillaires activés dès les premières heures de la réponse inflammatoire [14]. D'ailleurs, la forme particulière de son noyau l'aide à s'immiscer entre les cellules endothéliales : les différents segments de son noyau peuvent s'aligner de manière linéaire, facilitant ainsi son infiltration tissulaire [15]. Une fois dans le tissu, les neutrophiles sont activés par les PAMP et les DAMP, tel que décrit précédemment, mais également par des molécules endogènes tels des chimiokines ou des cytokines pro-inflammatoires [13].

Une des principales fonctions des neutrophiles est la destruction des agents pathogènes [13]. Ce processus est classiquement décrit en trois étapes. D'abord, le neutrophile phagocyte le microbe en liant un de ses récepteurs à une opsonine. Ensuite, les neutrophiles activés augmentent significativement leur production de radicaux libres et d'oxide d'azote (NO), molécules très réactives qui permettent de détruire les agents pathogènes phagocytés. Enfin, les granules des neutrophiles, qui contiennent divers protéinases et peptides anti-microbiens, se fusionnent au phagosome contenant l'agent pathogène, complétant la destruction microbienne. Ces granules peuvent également se fusionner à la membrane cytoplasmique, causant la libération extracellulaire de leur contenu.

Les neutrophiles sont également cruciaux pour leur production de cytokines et leur influence sur les autres cellules du système immunitaire. En effet, ils peuvent produire, entre autres, IL-1, IL-12, IL-17, IL-23, M-CSF, GM-CSF et diverses chimiokines [16-23]. L'action des neutrophiles peut avoir un impact sur le recrutement, l'activation ou la fonction des macrophages, des cellules dendritiques (DC) ou des lymphocytes [14]. Les neutrophiles produisent des chimiokines qui favorisent le recrutement des cellules dendritiques immatures (iDC) et ils contribuent à leur activation en produisant TNF- α [24]. Les neutrophiles peuvent également activer les DC via un contact cellule à cellule médié par l'interaction entre CD11b et DC-SIGN [25]. Les neutrophiles contribuent au recrutement des monocytes [26] et contribuent à leur différenciation en macrophages [27]. Ils peuvent produire de l'interféron-gamma (IFN- γ) suite à une stimulation par IL-12, contribuant à la différenciation des lymphocytes T et à l'activation des macrophages [28].

1.1.1.3 Monocytes et Macrophages dans la Réponse Immunitaire Innée

D'une manière semblable aux neutrophiles, les macrophages ont un rôle de première ligne dans la réponse immunitaire. Suite à l'initiation d'une réaction inflammatoire, les monocytes circulants sont recrutés au site concerné [29]. Après avoir infiltré le tissu inflammé, ils peuvent se différencier en macrophages ou en DC [30]. Sous l'effet du *Macrophage Colony-Stimulating Factor* (M-CSF) produit par des macrophages, fibroblastes et cellules endothéliales, les monocytes se différencient en

macrophages [31-33]. Cette différenciation est renforcée par la production d'IL-6 [33, 34].

Les fonctions des macrophages sont complexes et multiples. En effet, les macrophages sont sous-divisés en plusieurs catégories et expriment des phénotypes différents sous des conditions différentes. Lors de la réaction immunitaire primaire face à un agent pathogène, les neutrophiles produisent diverses cytokines telles IL-1, IL-6 ou TNF- α , induisant la différenciation des monocytes en macrophages pro-inflammatoires [35]. Ils contribuent alors à la production de cytokines pro-inflammatoires, telles TNF- α , IL-6, IL-12, IL-23 et les interférons de type I [36]. Concomitamment à cette sécrétion, les macrophages exercent une importante fonction de phagocytose. Ils contribuent à l'élimination des cellules sénescents ou apoptotiques, des débris cellulaires ou des agents pathogènes [35]. S'ils capturent des agents pathogènes, ils seront en mesure d'effectuer la présentation d'antigène aux lymphocytes. Cette dernière fonction est décrite en détails dans la prochaine section.

1.1.2 Cellules Présentatrices d'Antigènes et Présentation Antigénique

1.1.2.1 Physiologie de la Présentation Antigénique

Le système immunitaire inné réagit en premier lieu mais est insuffisant pour venir à bout d'une infection récalcitrante. Le système immunitaire adaptatif doit être à son tour activé afin de travailler de concert avec ce dernier. Les cellules présentatrices d'antigènes (APC), en assurant cette transition, accomplissent une étape cruciale de la réponse immunitaire.

Les DC sont d'importantes APC impliquées dans l'activation du système immunitaire adaptatif. Elles sont des cellules d'origine myéloïde largement répandues dans l'organisme et sont spécialisées dans la capture, le transport, la préparation et la présentation des antigènes aux lymphocytes T [37, 38]. Les DC réparties dans les tissus sont initialement considérées immatures, c'est-à-dire qu'elles sont incapables de provoquer l'activation des lymphocytes [39]. Suite à une injure microbienne, des récepteurs membranaires des DC lient des antigènes microbiens, provoquant leur endocytose [40]. Simultanément, les DC sont activées, d'une part par la liaison de

récepteurs à PAMP, tels les TLR, d'autre part par le contact avec des cytokines telles TNF- α ou IL-1 qui sont produites par le système immunitaire inné dans un contexte inflammatoire [40]. Les DC activées expriment alors des récepteurs à chimiokines. Ces récepteurs leur permettent de migrer, via les vaisseaux lymphatiques, vers les ganglions lymphatiques [41]. Les DC débutent alors leur maturation : les antigènes sont exprimés à la surface membranaire par les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) conjointement avec des molécules de costimulation [39]. Une fois arrivés dans les ganglions lymphatiques, les cellules dendritiques matures (mDC) entrent en contact avec les lymphocytes T naïfs, leur présentent l'antigène microbien et provoquent leur activation [42].

Le processus de préparation des antigènes mérite quelques précisions. Il existe deux types de CMH : type I et type II [39]. Les CMH de type II présentent les antigènes microbiens extracellulaires qui ont été internalisés. Ces CMH reconnaissent les corécepteurs CD4 des *T cell receptors* (TCR). Les CMH de type I, quant à eux, présentent des antigènes intracellulaires. En effet, certains antigènes pathogènes seront retrouvés dans le compartiment intracellulaire, comme dans le cas d'une infection virale. Les APC peuvent alors phagocyter la cellule infectée et en extraire les antigènes en question. Les antigènes sont associés à une molécule du CMH de type I et sont présentés à la surface. Il s'agit d'un phénomène nommé présentation croisée [43]. Les CMH de type I se lient aux corécepteurs CD8.

1.1.2.2 Les Cellules Dendritiques

Tel que décrit précédemment, les DC sont des cellules d'origine myéloïde qui constituent les principales APC impliquées dans l'activation des lymphocytes. Elles sont les seules APC capables de provoquer la réponse immunitaire primaire et d'amener le développement de la mémoire immunitaire [44]. Elles représentent toutefois un groupe hétérogène qui inclut différents sous-types.

Cellules Dendritiques Conventionnelles type 1 (cDC1) Les cDC1 sont des cellules d'origine myéloïde dont le nombre dans la circulation sanguine et les tissus représente le dixième de celui des cDC2 [45]. Elles étaient autrefois nommées DC myéloïdes 141+, mais CD141 a été identifié chez les cDC2 également. Elles sont caractérisées

par leur expression élevée de CD141, CD13 et CD33, mais leur expression de CD11b, CD11c et SIRP α est basse. Elles sont retrouvées dans les ganglions lymphatiques, la rate, la moelle osseuse, la peau, les poumons, les intestins et le foie [46]. Les cDC1 sont dotées de multiples mécanismes pour médier la reconnaissance et la préparation des antigènes intracellulaires. Elles possèdent le récepteur CLEC9A, leur permettant de reconnaître les filaments d'actines révélés par les cellules nécrotiques [47]. CLEC9A a également la capacité d'intégrer les antigènes cellulaires dans la voie moléculaire menant à la présentation croisée [48]. Elles sont également dotées de différents TLR, notamment TLR3 qui joue un rôle dans la réponse contre l'ARN viral [49]. Ainsi, les cDC1 sont principalement caractérisées par une importante capacité de présentation-croisée aux lymphocytes T CD8+. Toutefois, des études suggèrent qu'elles sont également capables de présenter des antigènes aux lymphocytes CD4 [50]. Elles sont capables de promouvoir la réponse TH1 des lymphocytes T CD4+ via la production d'IL-12, mais cette production est nettement inférieure à celle des cDC2 [50]. Les cDC1 sont également d'importantes cellules productrices d'interférons de type I [49] et III [51].

Cellules Dendritiques Conventionnelles type 2 (cDC2) Les cDC2 sont des cellules d'origine myéloïde qui constituent le principal sous-type de DC retrouvées dans le sang [52]. Elles étaient autrefois nommées DC myéloïdes CD1c+, mais il a été démontré que CD1c est exprimé par d'autres sous-types de DC [53]. Elles sont caractérisées par l'expression de CD1c, CD2, Fc ϵ R1, SIRP α , CD11b, CD11c, CD13 et CD33. Ces DC sont retrouvées dans les intestins [54], le foie [55], la peau [56] et la rate [45] et représentent le principal sous-type de DC dans les régions riches en lymphocytes des ganglions lymphatiques [46]. Les cDC2 possèdent une remarquable capacité à reconnaître les infections bactériennes. Elles sont pourvues de plusieurs types de TLR et peuvent répondre à différentes molécules bactériennes telles que le LPS ou la flagelline [57]. Elles expriment également Dectin-1 et Dectin-2, suggérant un rôle dans la reconnaissance fongique [58]. Les molécules CD1a et CD1c qu'elles expriment leur permettent de présenter plusieurs types d'antigènes de glycolipides [59]. Les cDC2 sont très versatiles. Elles peuvent produire diverses cytokines et chimiokines, notamment IL-1, IL-8, IL-10, IL-12 et TNF- α [60]. Elles ont la capacité d'activer les

lymphocytes TH1, TH2 et TH17 [45]. De plus, elles sont en mesure de faire la présentation-croisée [61] et d'activer les lymphocytes T CD8+ [60].

Cellules Dendritiques Plasmacytoïdes (pDC) Les pDC sont des DC qui, contrairement aux DC conventionnelles, sont complètement dénuées de marqueurs myéloïdes. En effet, elles n'expriment ni CD11b, CD11c, CD13 ou CD33. Elles peuvent être identifiées par leur expression de CD123, CD303, CD304 et CD45RA [46]. Les pDC ne sont que très peu exprimées dans les tissus et peuvent être retrouvées dans les ganglions lymphatiques [62]. Toutefois, elles sont abondamment recrutées en cas d'inflammation [62]. La principale fonction des pDC décrite dans la littérature est d'opposer une réponse sécrétoire aux infections virales [63]. En effet, elles sont dotées des récepteurs TLR7 et TLR9 qui répondent à l'ARN et l'ADN viraux respectivement [64]. L'activation de ces récepteurs induit la sécrétion de cytokines, principalement des interférons de type I [64]. Leur rôle dans la présentation antigénique est controversé et mal compris [46]. En effet, il a été suggéré que les pDC sont incapables d'activer les lymphocytes T CD4+ ou CD8+ naïfs [52]. Certaines études ultérieures suggèrent qu'elles auraient la capacité de faire la présentation croisée aux lymphocytes T CD8+ *in vitro* [65], mais il est possible que les cultures employées aient été contaminées par des précurseurs de DC myéloïdes, laissant planer un doute sur la fiabilité de ces résultats [46].

Cellules Dendritiques Dérivées des Monocytes (moDC)/Cellules Dendritiques Inflammatoires Les tissus inflammés sont infiltrés par des DC exhibant un profil pro-inflammatoire. Certaines proviennent de DC conventionnelles circulantes ayant été recrutées dans les tissus [66]. Toutefois, d'autres sont dérivées de monocytes recrutés dans le cadre du processus inflammatoire [66]. Les monocytes ont la capacité de se différencier en DC appelées moDC. *In vitro*, les moDC sont générées en cultivant des monocytes CD14+ avec GM-CSF et IL-4 [67]. Les moDC se distinguent des monocytes par leur expression de CD1a, CD1c et FC ϵ R et l'absence de CD14, CD16 et CD163 [46]. Les moDC se distinguent des cDC1/2 : alors que les DC conventionnelles ont tendance à migrer vers les ganglions lymphatiques pour activer les lymphocytes, les moDC resteraient dans les tissus afin de réguler la réaction inflammatoire locale [68]. Les moDC expriment IL-1, IL-12, IL-16 et IL-23 et TNF- α [69]. Elles ont la capacité

d'activer les lymphocytes T CD4+ et CD8+ [46] et de favoriser la polarisation TH17 [69].

1.1.2.3 Les Macrophages

Les macrophages, en plus de leur implication essentielle dans la phagocytose et la réponse immunitaire innée, interagissent avec le système immunitaire adaptatif via la présentation d'antigènes [70]. Les macrophages sont dotés de molécules du CMH de classe I et II et les utilisent pour présenter à leur surface les antigènes qui ont été phagocytés [71]. D'une part, les macrophages constituent un médiateur de la réponse effectrice des lymphocytes T. En effet, les lymphocytes T CD4+, après avoir été activés dans les ganglions lymphatiques par les DC, migrent vers les tissus inflammés et y rencontrent les macrophages [72]. Les macrophages présentent l'antigène au lymphocyte, induisant l'expression du ligand de CD40, CD40L [73]. De plus, cette interaction induit la production de cytokines par le lymphocyte, tel IFN- γ [74]. L'activation de CD40, parallèlement à la reconnaissance de cytokines inflammatoires, entraîne des modifications biochimiques chez le macrophage et active ce dernier [75]. Cette activation peut se traduire par, entre autres, une augmentation de la production d'enzymes lysosomiales favorisant la production de radicaux libres [76]. D'autre part, les macrophages pourraient jouer un rôle dans l'activation et la polarisation des lymphocytes T eux-mêmes. En effet, il a été suggéré que la présentation d'antigènes aux lymphocytes dans les tissus non-lymphoïdes est nécessaire à la polarisation complète des lymphocytes [77]. Certaines études récentes suggèrent même que les macrophages sont capables d'activer des lymphocytes T naïfs [78]. En somme, le fonctionnement des macrophages est très complexe. Ils peuvent adopter différents phénotypes dépendamment du contexte dans lequel ils évoluent. Il est possible, quoique quelque peu simpliste, de répartir ces phénotypes en deux catégories majeures : Les macrophages M1 et les macrophages M2.

Macrophages dits «Classiquement Activés» (M1) Les M1 sont considérés comme étant les macrophages pro-inflammatoires. À la suite d'une injure ou d'une infection, les macrophages adopteront ce phénotype. Cela peut se faire suite à la détection de PAMP, tel le LPS, par les macrophages [79], ou encore sous l'effet de différentes molécules retrouvées dans un contexte pro-inflammatoire : IFN- γ , TNF- α ou GM-CSF

[80]. Les macrophages M1 font la conversion d'arginine en NO, favorisant la production de radicaux libres [79]. Il y a augmentation de l'expression des molécules de costimulation CD80 et CD86 ainsi que de la production de plusieurs cytokines pro-inflammatoires, telles IL-1, IL-12, IL-23 ou TNF- α [81]. Les M1 produisent des chimiokines attirant plusieurs leucocytes pro-inflammatoires vers les tissus inflammés [81]. La combinaison de ces différents facteurs conduit à la polarisation des lymphocytes T CD4+ vers le phénotype TH1 [79]. Les TH1, via production de plusieurs cytokines telles IFN- γ , contribuent à renforcer le phénotype M1 des macrophages ainsi que, par conséquent, leur activité microbicide.

Macrophages dits «Alternativement Activés» (M2) Les macrophages M2, quant à eux, exhibent un phénotype anti-inflammatoire et favorisent la réparation tissulaire. Le phénotype M2 représente l'état de base des macrophages résidents dans un contexte physiologique [79]. Le TGF- β , qui est produit par les macrophages M2 eux-mêmes, contribue au maintien du phénotype M2 [82, 83]. À la suite d'une injure tissulaire, les macrophages détectent des DAMP, favorisant une infiltration cellulaire. En l'absence de PAMP détectables, les macrophages dérivés des monocytes recrutés adoptent le phénotype M2 [79]. D'autres stimuli contribuent à induire ou à préserver le phénotype M2 : IL-4, IL-10, IL-13, M-CSF ou les glucocorticoïdes [80]. Contrairement aux macrophages M1, les macrophages M2 convertissent l'arginine en ornithine, molécule précurseur du collagène favorisant la croissance et la réparation tissulaire [79]. Les M2 expriment davantage d'arginase et de récepteurs mannose ou *scavenger* ainsi que plusieurs cytokines anti-inflammatoires telles IL-10 ou TGF- β [81]. Les lymphocytes T CD4+ qui sont recrutés dans les tissus dans ce contexte vont se retrouver dans un milieu anti-inflammatoire, favorisant une réponse TH2 [79]. Les lymphocytes TH2 produiront davantage de cytokines anti-inflammatoires, comme IL-4, IL-10, IL-13 ou TGF- β , renforçant le phénotype M2 des macrophages [79].

1.1.2.4 Les Lymphocytes B

Les lymphocytes B sont un sous-type de leucocyte dont la tâche principale constitue la production d'anticorps contre les pathogènes. Les lymphocytes B ne sont pas un élément central du présent ouvrage, mais il est toutefois important de les

mentionner ici puisqu'ils possèdent une importante capacité de présentation d'antigènes. Lorsque les lymphocytes B rencontrent leur antigène, ce dernier se lie aux immunoglobulines des lymphocytes B. Ces derniers sont internalisés puis présentés par des molécules du CMH de type II [84]. Les lymphocytes T CD4+ qui ont été activés contre le même antigène vont le reconnaître et exprimer CD40L ainsi que diverses cytokines [85]. Ces signaux auront pour effet d'activer les lymphocytes B, résultant en l'expansion clonale des lymphocytes B, leur production d'anticorps, la commutation isotypique et la maturation d'affinité [85]. En plus de présenter des antigènes pour assurer leur propre activation, les lymphocytes B pourraient avoir un rôle dans l'activation des lymphocytes T. En effet, il a été démontré que les lymphocytes B seraient capables d'activer des lymphocytes T naïfs sous certaines conditions [86].

1.1.2.5 La Microglie

La microglie constitue une population cellulaire qui réside de façon homéostasique dans le SNC. Ces cellules ne sont pas issues de la circulation sanguine, mais proviennent plutôt de cellules précurseurs ayant migré vers le SNC durant le développement fœtal. Les cellules microgliales sont renouvelées continuellement à partir de ces précurseurs résidents. Les cellules microgliales sont phénotypiquement semblables aux macrophages. Comme les macrophages, les cellules microgliales sont dotées de plusieurs TLR [87] ainsi que de plusieurs autres types de récepteurs permettant la détection des DAMP [88]. Les cellules microgliales sont capables d'exprimer des molécules du CMH de types I et II. Dans un contexte homéostasique, les cellules microgliales expriment peu de molécules du CMH de type II, mais elles peuvent augmenter significativement leur expression dans un contexte inflammatoire [89]. Les molécules du CMH de type II constituent donc un marqueur d'activation microgliale [89]. Malgré cela, il est peu probable que les cellules microgliales soient impliquées dans l'activation des lymphocytes T naïfs. En effet, il n'a pas été démontré que les cellules microgliales soient, à l'instar des DC, capables de migrer depuis les tissus vers les ganglions lymphatiques pour présenter leur antigène aux lymphocytes T naïfs [90]. Les antigènes du SNC vont plutôt être drainés vers des sites adjacents, tels les ganglions lymphatiques cervicaux, où ils sont recapturés par

des DC pour être présentés aux lymphocytes [91]. Il a été proposé que la présentation d'antigènes par les cellules microgliales jouerait plutôt un rôle dans la réactivation des lymphocytes suite à leur infiltration dans le parenchyme [90].

1.1.3 Immunité Adaptative

1.1.3.1 Activation des Lymphocytes T

Les DC ayant migré aux ganglions lymphatiques présentent alors leur antigène aux lymphocytes T naïfs. L'antigène est reconnu par les TCR des lymphocytes T et le corécepteur du TCR reconnaît simultanément la molécule du CMH : CD4 reconnaît celles du CMH de type II, CD8 reconnaît celles du CMH de type I [92]. Des protéines associées au TCR, comme le complexe CD3 ou les chaînes ζ , assurent la transduction des signaux résultant en l'activation lymphocytaire [93]. Les molécules de costimulation CD80 et CD86, exprimées sur les DC activées, se lient aux récepteurs CD28 des lymphocytes, envoyant des signaux essentiels pour déclencher la réponse des lymphocytes T naïfs [94]. Lorsque les lymphocytes T reconnaissent leur antigène, ils augmentent leur expression de CD40L, qui se lie aux récepteurs CD40 des DC, résultant et l'augmentation de l'expression de CD80 et CD86 par ces derniers [95]. L'activation des lymphocytes T résulte également en l'expression de cytokines et d'autres molécules médiant leur réponse effectrice.

1.1.3.2 Lymphocytes T CD4+

Suite à leur activation, les lymphocytes T CD4+ peuvent être polarisés vers différentes sous-populations de lymphocytes. La sous-population favorisée dépend des conditions environnantes et détermine la fonction du lymphocyte. Les lymphocytes migrent vers les tissus inflammés et, après avoir reconnu leur antigène présenté par une APC, sécrètent certaines cytokines qui varient selon la sous-population à laquelle ils appartiennent.

T Helper Cell 1 (TH1) La cytokine IL-12, qui est produite par les macrophages inflammatoires, est une des principales cytokines favorisant la polarisation TH1 [96]. L'IFN- γ contribue également à cette polarisation de façon substantielle [97]. Les TH1

produisent principalement IFN- γ et IL-2. L'IFN- γ , en plus d'agir de façon autocrine pour favoriser la polarisation TH1, agit sur la microglie et les macrophages et augmente leur capacité de phagocytose [98]. IL-2 agit sur les lymphocytes T CD8+, favorisant leur prolifération et activation [99]. Les TH1 ont une réponse pro-inflammatoire qui contribue à l'élimination des pathogènes intracellulaires [100].

T Helper Cell 2 (TH2) IL-4 et IL-2 sont les principales cytokines impliquées dans la polarisation TH2 [101-103]. Les TH2 produisent principalement IL-4, IL-5, IL-9, et IL-13. Ces cytokines, en combinaison, favorisent la prolifération des lymphocytes B, l'infiltration des éosinophiles et la différenciation des macrophages vers le phénotype M2 [104]. De manière générale, les TH2 contribuent à combattre des parasites extracellulaires tels les helminthes et à faciliter la réparation tissulaire [104].

T Helper Cell 17 (TH17) Le mécanisme de polarisation des TH17 est plus complexe. Initialement, une combinaison de TGF- β et d'IL-6 est requise pour initier la polarisation de lymphocytes T CD4+ naïfs [105]. Ces cytokines induisent l'expression d'IL-21, qui agit de manière autocrine pour favoriser la polarisation [106]. IL-21 permet de remplacer l'effet d'IL-6 et contribue à maintenir la polarisation en l'absence d'IL-6 [107]. L'influence de ces cytokines a pour effet d'induire l'expression des récepteurs d'IL-23 par les lymphocytes [108, 109]. IL-23 peut alors influencer ces derniers, complétant et assurant le maintien de la polarisation TH17 [110]. Une fois polarisées, les TH17 produisent principalement IL-17, IL-21 et IL-22. IL-17 induit la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles TNF- α , IL-1 et IL-6 ainsi que des chimiokines, favorisant le recrutement de cellules inflammatoires [111]. IL-21, en plus de son influence autocrine, contribue à l'activation des lymphocytes T et B [112]. IL-22 favorise la production de peptides anti-microbiens et participe à la défense contre les pathogènes bactériens [113]. De manière générale, les TH17 contribuent à combattre les pathogènes bactériens extracellulaires et les fungi [114].

Regulatory T Cell (Treg) La polarisation des lymphocytes CD4+ naïfs en Treg requiert l'influence concomitante d'IL-2 et TGF- β [115]. Les Treg produisent principalement IL-10, TGF- β et IL-35 [116, 117]. IL-10 a un effet anti-inflammatoire très important et contribue de façon significative à diminuer les dommages tissulaires causés par

l'inflammation [118]. De manière générale, les Treg ont un profil anti-inflammatoire [117].

1.1.3.3 Lymphocytes T CD8+

Après avoir été activés dans les ganglions lymphatiques, les lymphocytes T CD8+ migrent vers la circulation sanguine. Ils infiltrent ensuite les tissus inflammés et y reconnaissent leur antigène [119]. Cet antigène, associé à une molécule du CMH de type I, est exprimé non pas par une APC professionnelle, mais par n'importe quel type de cellule qui a été infectée par un pathogène intracellulaire [120]. Les lymphocytes T CD8+ adhèrent fortement aux cellules infectées grâce à leurs intégrines [121]. L'interaction entre l'antigène et le TCR mène à l'exocytose du contenu des granules des lymphocytes T CD8+ [122]. Ces granules contiennent des molécules de perforine et des granzymes [123]. Ces molécules pénètrent la cellule infectée par endocytose [124]. La perforine s'insère alors dans la membrane endosomiale et permet le transfert des granzymes vers le cytoplasme [125]. Les granzymes clivent et activent d'autres enzymes nommées caspases [126]. Les caspases activées induisent alors l'apoptose de la cellule infectée [126]. Les cellules apoptotiques sont alors phagocytées et éliminées.

Les lymphocytes T CD8+ possèdent également la capacité de sécréter des cytokines. En effet, ils peuvent sécréter IFN- γ , TGF- β , IL-4 et IL-10 [127]. Ces cytokines peuvent avoir un effet sur les lymphocytes T CD4+ adjacents, favorisant la différenciation ou la suppression de ces derniers [127].

1.2 La Sclérose en Plaques

1.2.1 Généralités

1.2.1.1 Épidémiologie

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune du SNC caractérisée par une démyélinisation axonale. Sa prévalence au Canada est estimée à 240 par 100 000 [128]. En fait, plusieurs études suggèrent que la prévalence de la SEP au Canada est une des plus élevées à travers le monde [129-131]. Par comparaison, l'incidence mondiale de la SEP était de 33 par 100 000 en 2013 [132].

L'incidence varie entre 5 et 12 par 100 000 au Canada, dépendamment des études et des provinces [129-131]. Ces mêmes études suggèrent que la prévalence au Canada augmente progressivement d'année en année, mais l'incidence demeure stable [130, 131].

La SEP n'est pas répartie équitablement entre tous les groupes démographiques. Notamment, 78% des personnes atteintes de SEP sont des femmes [133]. Le diagnostic de SEP est habituellement posé entre l'âge de 20 et 50 ans [134]. Les pics d'incidence sont de 40 ans chez les femmes et de 45 ans chez les hommes [135]. Les pics de prévalence, eux, sont de 56 et 59 ans respectivement.

En ce qui a trait aux facteurs de risque, une méta-analyse a démontré une association robuste avec la mononucléose infectieuse et le tabagisme [132]. Il a été longuement suggéré que la latitude géographique ait une influence significative sur le risque de développer la SEP. En effet, une exposition solaire prolongée, maximale près de l'équateur et qui diminue progressivement vers les pôles, augmenterait le métabolisme de la vitamine D, diminuant le risque de SEP [136]. Certaines méta-analyses semblent valider cette association [137]. D'autres études, toutefois, ne démontrent aucune corrélation [138, 139].

1.2.1.2 Pathologie

La SEP a été classiquement décrite par Charcot qui avait observé la présence de plaques sclérosées situées autour des ventricules, dans le pont et dans la moelle épinière [140]. Ces plaques résultent de la démyélinisation causée par des infiltrats inflammatoires périvasculaires qui sont présents dès les stades les plus précoces de la maladie [141]. Ces infiltrats contiennent des lymphocytes T CD4+ et CD8+, ces derniers étant présents en plus grands nombres [142]. Les plaques contiennent également, dans une moindre mesure, des lymphocytes B et des plasmocytes [143]. Les lésions actives sont massivement infiltrées par des macrophages et cellules microgliales qui expriment des molécules du CMH de type II, suggérant une capacité de présentation antigénique [144, 145]. On retrouve dans les lésions actives des macrophages emplis de myéline qui participent directement à la démyélinisation [146]. Dans les lésions inflammatoires chroniques, on retrouve des macrophages et

microglies activées qui s'accumulent à la périphérie des lésions [147]. Le processus inflammatoire induit une gliose, avec prolifération des astrocytes, mais aussi la destruction des oligodendrocytes, résultant en la démyélinisation des axones [145]. Des transections axonales sont notées au niveau des lésions, résultant en des dommages neurologiques permanents [148].

1.2.2 Rôle des Cellules Présentatrices d'Antigènes en Sclérose en Plaques

Les APC, du fait de leur rôle dans l'activation et la régulation des lymphocytes, leur production de cytokines et, dans certains cas, leur capacité de phagocytose, ont un rôle important à jouer dans la SEP et l'auto-immunité en général. Les APC jouent également un rôle crucial dans le développement de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle animal de la SEP [149, 150]. Tel que décrit plus bas, la présence de lymphocytes T activés et auto-réactifs contre des antigènes de myéline constitue un aspect crucial dans la pathogénèse de la SEP. L'implication des APC dans cette activation est suggérée par plusieurs études. Il a été démontré que des APC peuvent migrer depuis le SNC vers les ganglions lymphatiques cervicaux [151]. Une étude portant sur un modèle d'EAE démontre que des APC contenant de la myéline sont présents dans ces ganglions lymphatiques, qu'ils sont adjacents aux lymphocytes T et expriment des molécules du CMH de type II ainsi que des molécules de co-stimulation [152]. La présentation d'un antigène lié à une molécule du CMH ainsi que l'expression de molécules de co-stimulation par une APC sont cruciales à l'activation des lymphocytes T. Il doit être également considéré que la polarisation des lymphocytes T CD4+ vers un sous-type particulier dépend de la production de cytokines des APC [153]. En EAE, les lymphocytes TH1 et TH17 contribuent tous deux à la progression de la maladie [154, 155]. Les lymphocytes activés infiltrent le cerveau et y sont réactivés par d'autres APC, étape essentielle à l'induction de la maladie [156]. Les APC contribuent davantage au processus pathologique en présentant aux lymphocytes ayant récemment infiltré le SNC de nouveaux antigènes de myéline qui sont différents de ceux ayant initié la maladie [157]. L'implication cruciale des APC à diverses étapes-clé de l'EAE soulève la possibilité que les APC soient impliquées

également en SEP. Les principales APC impliquées dans la pathophysiologie de la SEP sont les DC, les macrophages, la microglie et les lymphocytes B.

1.2.2.1 Cellules Dendritiques

Les DC sont retrouvées dans les lésions inflammatoires aussi bien en SEP qu'en EAE. En SEP, des DC contenant des débris de myéline sont retrouvés dans le manchon périvasculaire des lésions aussi bien actives que chroniques [158]. On en retrouve même dans l'espace périvasculaire et le parenchyme de zones de matière grise non lésionnelle [159]. En plus de s'accumuler dans les lésions, les DC des patients atteints de SEP exhibent également un profil pro-inflammatoire. En effet, leurs DC circulantes produisent davantage d'IFN- γ , de TNF- α et d'IL-6 que celles des donneurs sains [160]. De plus, les patients atteints de SEP ont davantage de DC dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) et ces dernières ont une plus grande expression des marqueurs de maturation CD80 et CD86 que leurs DC circulantes [161]. *In vitro*, les DC des patients atteints de SEP produisent davantage d'IL-23 lorsque stimulées [162]. Les DC circulant dans le sang ainsi que celles trouvées dans le LCR expriment davantage le récepteur à chimiokines CCR5 que celles des contrôles sains [161]. Des ligands de CCR5, CCL3 et CCL5, sont retrouvés en plus grandes quantités dans les lésions actives, mécanisme qui permet peut-être la migration des DC circulantes vers le SNC [163]. Lorsque des monocytes traversent la barrière hémato-encéphalique (BHE), certains d'entre eux se différencient en DC qui favorisent l'expansion de lymphocytes TH1 et TH17 [164]. Les mDC périvasculaires produisent de l'IL-23 [165]. De plus, les DC périvasculaires dans les lésions sont parfois adjacentes à des lymphocytes T CD8+ en prolifération, suggérant que les DC recrutées contribuent à l'activation lymphocytaire dans le SNC [158].

En EAE, on note une accumulation substantielle de DC dans le SNC [154]. Ces DC sont produites dans la moelle osseuse et sont recrutées à partir de la circulation périphérique [154]. Elles infiltrent le parenchyme du SNC en traversant l'endothélium microvasculaire cérébral et, ce faisant, acquièrent un phénotype mature [166]. Ces DC s'accumulent dans l'espace périvasculaire en contiguïté avec des lymphocytes T CD4+ [154]. L'infiltration des DC dans le SNC précède de peu l'apparition de la maladie [167].

Les DC contribuent significativement à la présentation d'antigènes en EAE. Les DC infiltrés dans le SNC augmentent leur expression de marqueurs de maturation tel CD86 et expriment davantage de molécules du CMH de classe II [168]. En EAE, les DC produisent IL-6, IL-23 et TGF- β et induisent préférentiellement la polarisation TH17 [154, 169]. Ces caractéristiques se traduisent par la capacité des DC à activer des lymphocytes T mémoires et naïfs en présentant des antigènes de myéline *in vitro* [149, 169], ainsi que par leur capacité d'induire l'EAE même en l'absence des autres types d'APC [150]. Une étude démontre que lorsque des DC extraites des méninges de souris EAE sont mises en culture avec des lymphocytes T CD4+ spécifiques à un antigène de myéline, ces DC induisent une prolifération plus importante que celle induite par les DC extraites des ganglions lymphatiques ou de la moelle épinière du même animal [170]. Enfin, l'induction de l'apoptose des DC suffit à diminuer le score clinique de l'EAE [171].

1.2.2.2 Macrophages et la Microglie

Les macrophages et les cellules microgliales sont des cellules d'origines différentes. Toutefois, en SEP et en EAE, les deux types de cellules sont recrutés aux mêmes sites. Macrophages et microglie ont des fonctions convergentes dans un contexte inflammatoire, ont un phénotype similaire et partagent plusieurs marqueurs d'identification. D'un point de vue technique, il peut être difficile de les différencier *in situ* et beaucoup d'études les traitent comme étant un seul groupe. Ces deux types de cellules sont donc regroupés dans cette section.

Les macrophages/microglies (M/M) sont présents en plus grands nombre dans le SNC des patients atteints de SEP, et ce, à divers endroits. D'une part, il y a une accumulation de M/M à la périphérie des lésions chroniques [172, 173]. Ces cellules expriment des molécules du CMH de type II et contiennent des composantes de myéline [172]. Les M/M recueillis à la périphérie des lésions chroniques exhibent un profil anti-inflammatoire lorsqu'exposés à des composantes de myéline *in vitro*, suggérant un rôle anti-inflammatoire de ces cellules [172]. D'autre part, il est possible d'observer des M/M au cœur des lésions dans l'espace périvasculaire [174]. Ces M/M auraient un rôle pro-inflammatoire. En effet, la microglie constitue les principaux

phagocytes impliqués dans la phagocytose de la myéline dans les lésions actives précoces et joueraient un rôle important lors des premières étapes de la démyélinisation [175]. Les macrophages expriment de l'oxyde d'azote synthétase inductible (iNOS) dans les lésions de SEP actives, mais pas dans les lésions chroniques, ce qui pourrait contribuer à la démyélinisation [176]. Une étude démontre que dans les lésions de SEP, CCL-2 et CCL-3 sont produits par les macrophages alors que CCL-4 est produit par les macrophages et les cellules microgliales. Cette production pourrait contribuer au recrutement des lymphocytes T et des phagocytes mononucléaires dans les lésions [177]. Les macrophages périvasculaires exhibent une expression plus élevée des molécules de costimulation CD80 et CD86, de CD40 et des molécules du CMH de type II dans les lésions actives et chroniques [174]. Les cellules microgliales, quant à elles, expriment les molécules de costimulation CD80 et CD86 lorsqu'activées *in vitro* ainsi que dans les lésions actives [178, 179]. La microglie exprime aussi des molécules du CMH de type II en grandes quantités dans les lésions SEP [180]. Les M/M dans les lésions de SEP expriment la cytokine IL-23 [165]. Les macrophages et les lymphocytes T sont en étroite relation dans les infiltrats périvasculaire, suggérant une interaction entre les deux [174]. Une étude *in vitro* démontre que la microglie activée peut activer les lymphocytes T CD4+ et causer des dommages neuronaux [181]. Mises ensemble, ces données suggèrent que les macrophages périvasculaires favorisent la démyélinisation, font la phagocytose des fragments de myéline, favorisent l'entrée des leucocytes dans les lésions par la production de chimiokines et expriment des cytokines et molécules de co-stimulation permettant la réactivation des lymphocytes T lors de leur infiltration.

Les M/M ont également un rôle important à jouer en EAE, et ce, dès le début de la maladie. En effet, la microglie devient active avant même le recrutement des leucocytes périphériques ou le début des symptômes [182]. L'importance de cette activation précoce a été démontrée par un modèle murin transgénique. Suite à l'inhibition pharmacologique de l'activation microgliale chez ces animaux, une diminution significative de la progression de la maladie a été observée [183]. Cette importance précoce peut partiellement être expliquée par le fait que la production de CCL2 par la microglie est nécessaire au recrutement de DC et macrophages effecteurs

dans le SNC depuis la périphérie et que ce mécanisme contribue au développement de l'EAE [184]. Les M/M peuvent également avoir un rôle par leur production de cytokines. En EAE, les M/M du SNC démontrent un pic d'expression de la cytokine IL-23 tôt dans le développement de la maladie. Plus tard, ces mêmes cellules ont un pic d'expression d'IL-12 qui concorde avec le pic de la maladie. L'IL-23 produit par les M/M pourrait contribuer au développement de l'EAE à des stades précoces [185]. La fonction de présentation d'antigènes de ces cellules a été également impliquée en EAE. Au pic de la maladie, les cellules microgliales activées représentent 37% des APC trouvées dans les lésions et sont adjacentes aux leucocytes infiltrants [182]. Chez le rat, les cellules microgliales peuvent faire la phagocytose de la myéline produite par des oligodendrocytes et exprimer des molécules du CMH de type II [186]. Les cellules microgliales prolifèrent davantage en EAE et augmentent leur expression de CD45, des molécules du CMH de type II, de CD40, de CD86 et du marqueur CD11c, reflétant une capacité d'activation lymphocytaire augmentée [182]. Cette capacité des M/M a déjà été validée *in vitro*, où des M/M purifiés à partir de souris EAE sont capables d'induire la prolifération des lymphocytes T CD4+ [149]. De plus, les cellules microgliales murines sont capables de présenter un antigène aux lymphocytes T CD4+ et de favoriser la polarisation vers le sous-type TH1 [187]. En EAE, il a été démontré que les lymphocytes T interagissent avec les M/M dans l'espace extravasculaire, ce qui a pour effet d'augmenter l'expression d'IFN- γ , TNF- α et IL-17 par les lymphocytes T [188]. Ce rôle d'activation lymphocytaire des M/M dans l'EAE n'est pas accessoire. Ceci a été démontré par d'autres études qui révèlent que la simple inhibition de l'expression de CD40 par les cellules microgliales suffit à diminuer significativement l'effet encéphalitique des lymphocytes T, diminuer l'infiltration lymphocytaire dans le SNC et améliorer le score clinique [189, 190]. Une clarification importante doit toutefois être faite. Il a été démontré que les M/M sont moins efficaces que les DC pour activer les lymphocytes T naïfs [149]. Il est probable que ces cellules soient davantage impliquées dans la réactivation des cellules infiltrant le SNC que dans l'activation initiale [149, 191].

1.2.3 Lymphocytes T en Sclérose en Plaques

1.2.3.1 Auto-Réactivité contre les Antigènes de Myéline des Lymphocytes T

Les lymphocytes T ont un rôle important dans la pathogénèse de la SEP. En effet, le phénomène d'auto-immunité dépendrait de l'action de lymphocytes T spécifiques contre des antigènes du soi qui auraient échappé au processus de tolérance centrale dans le thymus lors du développement. Plusieurs études ont tenté de mettre en évidence l'antigène potentiellement en cause dans la SEP, suspectant le plus souvent des antigènes de la myéline tels *myelin basic protein* (MBP), *proteolipid protein* (PLP) et *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG). Or, les patients atteints de SEP ont une fréquence de lymphocytes T réactifs contre ces antigènes semblable à celle des contrôles sains [192-194]. La différence entre les patients atteints de SEP et les contrôles sains ne réside pas dans la fréquence des lymphocytes T auto-réactifs mais plutôt dans le phénotype de ces derniers. Par exemple, les lymphocytes T des patients atteints de SEP prolifèrent davantage suite à une exposition à des antigènes de myéline [195]. De plus, ils expriment davantage CCR5, IL-2, IFN- γ et TNF- α [196]. D'autres études portant sur les lymphocytes T CD4+ en particulier démontrent que les lymphocytes T CD4+ des patients atteints de SEP possèdent une plus grande avidité pour les antigènes de myéline et présentent un phénotype pro-inflammatoire [197]. Ces lymphocytes ont également une plus grande réactivité à la cytokine IL-2 [198]. Cette différence est particulièrement importante, considérant que la concentration d'IL-2 et de récepteurs à IL-2 dans le LCR est plus élevée chez les patients atteints de SEP en phase active de la maladie [199]. Pour ce qui est des lymphocytes T CD8+ des patients atteints de SEP, ils ont une plus grande auto-réactivité contre des antigènes de myéline et expriment davantage d'IFN- γ et de TNF- α [200]. Ces mêmes cellules sont également capables de reconnaître les antigènes de myéline exprimés sur des molécules du CMH de type I par des cellules autologues et de provoquer la lyse de ces cellules [200]. Les résultats d'un essai clinique permettent de confirmer l'importance des lymphocytes T réactifs contre les antigènes de myéline *in vivo*. Des peptides d'antigènes de myéline altérés furent utilisés pour traiter des patients atteints de SEP, ce qui résulta en une exacerbation de la maladie. Ce constat démontre que l'activation périphérique de lymphocytes T spécifiques contre la myéline peut induire des dommages

inflammatoires dans le SNC [201]. D'ailleurs, le principal modèle animal utilisé pour étudier la SEP, l'EAE, dépend principalement de l'action de lymphocytes T auto-réactifs. Dans l'EAE active, des antigènes de myéline émulsifiés dans un adjuvant sont injectés, induisant une réponse auto-immune des lymphocytes T contre ces derniers [202]. Dans l'EAE passive, la simple injection de lymphocytes T réactifs contre des antigènes de myéline suffit à causer le développement de la maladie [203]. Ces observations indiquent que ce n'est pas la présence de lymphocytes T auto-réactifs qui contribue à la pathogénèse de la SEP, mais plutôt le phénotype pro-inflammatoire de ces derniers.

1.2.3.2 Migration des Lymphocytes T à Travers la Barrière Héo-Encéphalique

À la suite de leur activation, les lymphocytes T réactifs contre des antigènes de myéline doivent être en mesure d'infiltrer le SNC afin de contribuer au développement des lésions. Ceci n'est pas une tâche aisée, puisque dans un contexte physiologique, la BHE restreint la migration des leucocytes depuis la périphérie [204]. En SEP, les lymphocytes T activés expriment plusieurs molécules, incluant récepteurs à chimiokines, molécules d'adhérence et métalloprotéinases matricielles permettant l'infiltration massive des leucocytes dans les lésions [204]. Un mécanisme particulièrement important impliqué dans la migration des lymphocytes T à travers la BHE est l'expression de molécules d'adhérence par la BHE et leur interaction avec leurs ligands. La molécule d'adhérence *Vascular Cell Adhesion Molecule 1* (VCAM-1) est exprimée par les cellules endothéliales de la BHE et cette expression est augmentée par des stimuli pro-inflammatoires [205]. Un anticorps monoclonal nommé Natalizumab peut bloquer VLA-4, un ligand de VCAM-1 et inhiber la migration des lymphocytes T à travers la BHE [206]. La molécule d'adhérence *Melanoma Cell Adhesion Molecule* (MCAM) est exprimée par l'endothélium de la BHE ainsi que par les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ [207, 208]. Les lymphocytes T CD4⁺ MCAM⁺ expriment davantage d'IL-17 que les MCAM⁻ et sont présents en plus grands nombres dans le sang et le SNC des patients atteints de SEP comparativement à ceux des contrôles sains [207]. Les lymphocytes T CD8⁺ MCAM⁺, quant à eux, expriment davantage d'IL-17, IFN- γ , TNF- α et GM-CSF que les MCAM⁻ et présentent une

cytotoxicité augmentée contre les oligodendrocytes [208]. Le blocage de MCAM contribue à diminuer la migration des lymphocytes TH17 et CD8+ à travers la BHE et diminue la sévérité de l'EAE [207, 208]. Les molécules *Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule* (ALCAM) sont exprimées par les cellules endothéliales de la BHE et plusieurs leucocytes, incluant les lymphocytes T activés [209, 210]. Une étude suggère que l'ALCAM exprimée par la BHE pourrait contribuer à la migration des lymphocytes T CD4+ via leur interaction avec CD6 [210]. Des études ultérieures révèlent toutefois que ALCAM est davantage impliquée dans la migration des monocytes CD14+ ainsi qu'au maintien de l'intégrité de la BHE [211, 212]. Ces molécules d'adhérence font actuellement l'objet de recherches intensives puisque leur inhibition peut diminuer l'infiltration des leucocytes à travers la BHE et constituent ainsi des cibles thérapeutiques prometteuses.

1.2.3.3 Fonctions Effectrices des Lymphocytes T CD4+

Après avoir été activés en périphérie, traversé la BHE et été réactivés dans le SNC par des APC, les lymphocytes T CD4+ influencent l'évolution de la lésion inflammatoire via leur production de cytokines. Pendant longtemps, le sous-type TH1 a été considéré comme étant le principal sous-type impliqué autant en SEP qu'en EAE, et ce, pour plusieurs raisons. Il a été observé que l'évolution clinique de la SEP corrélait avec l'expression d'IL-12 et d'IFN- γ dans le SNC et le LCR [213]. De plus, la SEP est exacerbée par l'administration d'IFN- γ [214]. Plusieurs études d'EAE validaient ces observations. On y notait une expression d'IFN- γ par les cellules infiltrant le SNC et la présence d'IL-12 dans les lésions [215]. De plus, la maladie pouvait être provoquée par le simple transfert de lymphocytes TH1 [216]. L'abrogation génétique de T-bet, facteur de transcription essentiel à la polarisation vers le sous-type TH1, inhibe le développement de l'EAE [217].

La prédominance des lymphocytes TH1 dans la pathogénèse de la SEP et de l'EAE a toutefois été remise en question par plusieurs études. Notamment, l'injection d'anticorps contre IFN- γ avait pour effet d'aggraver la progression de l'EAE [218]. Un phénomène similaire a été observé avec un modèle transgénique où l'expression d'IFN- γ ou de son récepteur était abrogée [219, 220]. L'importance des lymphocytes

TH17 a été démontrée par une étude utilisant des modèles transgéniques d'EAE qui a révélé que, contrairement à IL-12, IL-23 est nécessaire au développement de l'EAE. L'expression des cytokines IL-12 ou IL-23 ont été génétiquement abrogées de manière sélective. Les souris avec production déficiente d'IL-23 étaient résistantes à l'EAE, alors que les souris privées d'IL-12 développaient la maladie de façon plus sévère [221]. Le rôle des lymphocytes TH17 dans l'EAE est confirmé par le fait que le transfert de cellules TH17 permet d'induire la maladie [222]. Une autre étude démontre que la délétion du récepteur d'IL-27, inhibiteur de la production d'IL-17 par les cytokines, rend les souris particulièrement susceptibles à l'EAE [223]. Ces études suggèrent que ce sont les cellules TH17 et non TH1 qui sont responsables du développement de l'EAE. Plusieurs études démontrent l'importance des lymphocytes TH17 dans la SEP. Notamment, on note la présence d'IL-23 dans les lésions de SEP [165]. De plus, il y a un nombre élevé de lymphocytes TH17 et une grande quantité d'IL-17 présents dans le cerveau des patients [224]. On note aussi que les taux d'IL-17 sont augmentés dans le sang et le LCR de ces patients, particulièrement lors des épisodes aigus [225]. Ensuite, il y a une corrélation importante entre la production d'IL-17 par les cellules mononucléaires exposées à des protéines de MOG en culture et le nombre de lésions actives observées à l'IRM [226]. Il est également possible de voir une corrélation entre les taux sériques d'IL-17 et le nombre d'épisodes aigus [227].

Les lymphocytes TH1 et TH17 contribuent à l'évolution de la SEP en grande partie par leur production de cytokines. IFN- γ , IL-17, IL-22 et GM-CSF sont détectables dans le LCR et les lésions des patients, particulièrement durant les épisodes aigus [228-231]. Les lymphocytes TH17 ont probablement un rôle prédominant, considérant qu'environ les trois quarts des lymphocytes présents dans les lésions expriment IL-17 [224]. Les lymphocytes TH17 sont particulièrement aptes à faciliter l'infiltration des leucocytes dans le SNC. En effet, ces derniers produisent IL-17 et IL-22, ce qui a pour effet de perturber les jonctions serrées et perméabiliser la BHE [232]. Il en résulte que les lymphocytes TH17 migrent aisément à travers la BHE et favorisent le recrutement des lymphocytes T CD4+[232]. Les lymphocytes TH17 contribuent aux dommages cellulaires observés en SEP. Une étude démontre qu'ils expriment des taux élevés de granzyme B et peuvent provoquer la mort de neurones humains [232]. Il existe des

lymphocytes nommés TH1/TH17 qui peuvent produire à la fois IFN- γ et IL-17. Ces derniers infiltrent le SNC précocement en EAE, pouvant suggérer un rôle dans l'activation microgliale [233]. On retrouve ces cellules dans le sang et le cerveau des patients atteints de SEP et elles ont une capacité considérable à traverser la BHE [230].

1.2.3.4 Fonctions Effectrices des Lymphocytes T CD8+

Une des preuves les plus évidentes de l'implication des lymphocytes T CD8+ dans la SEP est leur présence abondante dans les lésions. En effet, des études antérieures suggèrent que les lymphocytes T CD8+ prédominent largement dans le parenchyme et les manchons périvasculaires des lésions de SEP, bien que des études récentes suggèrent plutôt que leur nombre est presque équivalent à celui des lymphocytes T CD4+ [234-236]. En plus de leur présence dans les lésions, certains aspects fonctionnels des lymphocytes T CD8+ suggèrent leur implication dans la SEP. Par exemple, plusieurs études suggèrent que certains allèles des CMH de type I constituent un facteur de risque pour la SEP [237, 238]. De plus, une étude d'imagerie démontre que l'évolution de la maladie corrèle mieux avec le profil d'expression de cytokines des lymphocytes T CD8+ que celui des lymphocytes T CD4+ [239]. L'implication des lymphocytes T CD8+ dans la pathogénèse de la SEP est appuyée par des études murines qui démontrent que le transfert de lymphocytes T CD8+ réactifs contre la myéline peuvent induire un phénomène neuro-inflammatoire sévère qui ressemble davantage à la SEP d'un point de vue clinique et pathologique que l'EAE induite par le transfert de lymphocytes T CD4+ [240, 241].

D'une part, les lymphocytes T CD8+ peuvent contribuer à la maladie par leur production de cytokines. Des lymphocytes T CD8+ IL-17+ sont trouvés en en plus grand nombre particulièrement dans les lésions actives, suggérant un rôle pro-inflammatoire [224]. Toutefois, la production des cytokines IL-2, IL-4 et IL-13 par les lymphocytes T CD8+ corrèle négativement avec l'évolution de la maladie telle qu'évaluée par IRM, suggérant une potentielle lacune de l'activité anti-inflammatoire des lymphocytes T CD8+ chez les patients atteints de SEP [239].

D'autre part, les lymphocytes T CD8+ peuvent contribuer au développement de la SEP du fait de leur activité cytotoxique. La capacité des lymphocytes T CD8+ à

causer des dommages aux axones et aux oligodendrocytes a déjà été démontrée *in vitro* [242, 243]. Plusieurs études suggèrent que ce même phénomène se produit *in vivo*. Dans les lésions de SEP, les neurones, astrocytes et oligodendrocytes expriment des molécules du CMH de type I [144]. Dans les lésions de SEP, on retrouve des lymphocytes T CD8+ à proximité d'oligodendrocytes et d'axones démyélinisés [244]. Les granules cytotoxiques de ces lymphocytes sont polarisées en direction des neurones, suggérant une attaque cytotoxique directe [244]. Cette proximité ne semble pas fortuite, puisque la présence de ces lymphocytes cytotoxiques corrèle avec le degré de dommages axonaux [245]. Ces données suggèrent que l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+ pourrait être impliquée dans la pathogénèse de la SEP.

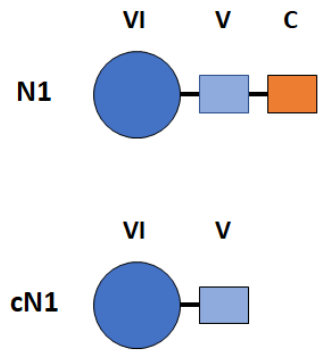
1.3 Nétrine-1

1.3.1 Nétrine-1 et ses Récepteurs

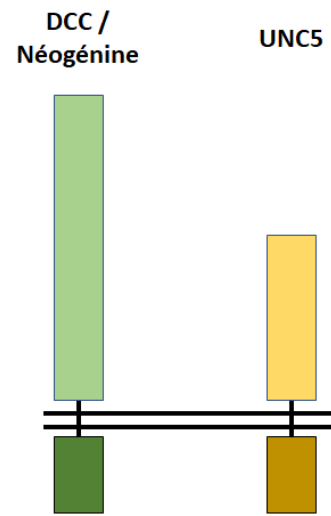
1.3.1.1 Structure de Nétrine-1

Nétrine-1 (N1) est une protéine ayant une structure similaire à celle de la laminine, qui est une protéine structurelle composant la membrane basale de plusieurs tissus [246]. N1 possède 3 domaines : domaine VI, domaine V et le domaine C-terminal. (**Fig.1A**) Les domaines VI et V possèdent une homologie substantielle à des domaines de la laminine [247]. Ce n'est toutefois pas le cas pour le domaine C-terminal [248]. N1 possède deux principaux sites d'attachement à ses récepteurs [249]. Un de ces sites est spécifique aux récepteurs de la famille *Deleted in Colorectal Cancer* (DCC)/Néogénine et est situé sur le domaine V, à proximité du domaine C-terminal. L'autre site est dit générique et peut se lier autant aux récepteurs de la famille DCC/néogénine que ceux de la famille UNC5. Ce site est localisé sur le domaine V, à proximité du domaine VI. La protéine N1 n'existe pas uniquement dans sa forme complète, mais on peut la retrouver également sous une forme clivée (cN1) [250]. Cette forme comporte les domaines VI et V, mais le domaine C-terminal est absent.

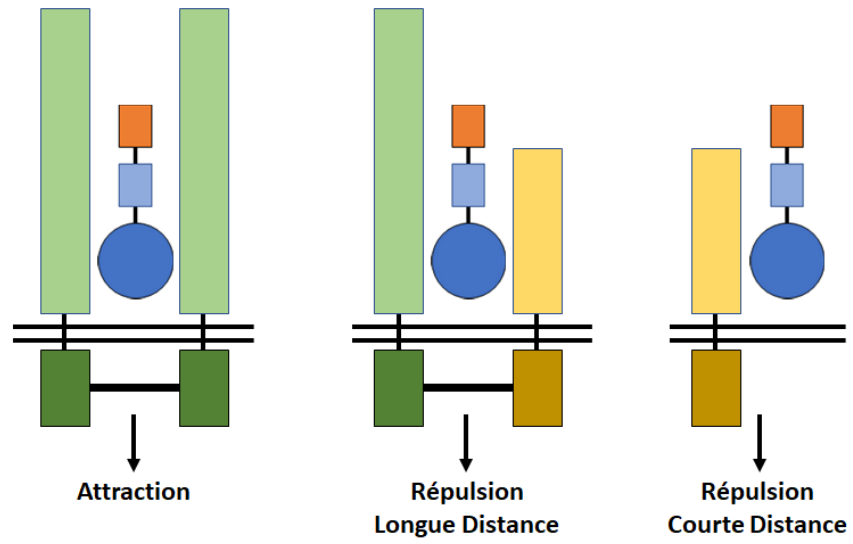
A)



B)



C)



D)

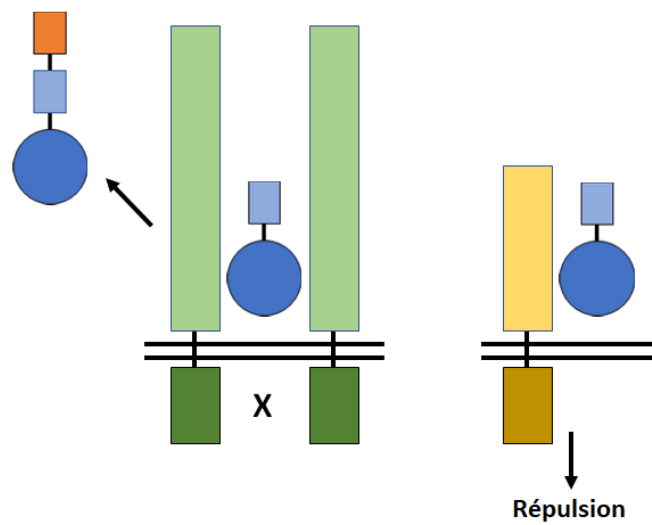


Figure 1. Structure de Nétrine-1 et de ses récepteurs.

Schéma représentatif de Nétrine-1, dans ses formes complète et clivée, et de ses récepteurs. A) La protéine Nétrine-1 (N1) est représentée avec ses 3 domaines : domaine VI, domaine V et domaine C-terminal. La protéine N1 clivée (cN1) est une forme tronquée de Nétrine-1 et est dépourvue du fragment C-terminal. B) Représentation des deux familles principales de récepteurs de N1. La famille *Deleted in Colorectal Cancer* (DCC) et néogénine, et la famille UNC5. C) Description du fonctionnement des récepteurs de N1. Lorsque N1 se lie aux récepteurs de la famille DCC/néogénine, elle cause une homodimérisation de ces récepteurs. Cette interaction provoque une attraction axonale. N1 peut également se lier à la fois à un récepteur de la famille DCC/néogénine et un récepteur de la famille UNC5. Il en résulte une hétérodimérisation, ce qui provoque la répulsion axonale à longue distance. Enfin, N1 peut simplement se lier à un récepteur UNC5, l'activant et provoquant une répulsion axonale à courte distance. D) Description de l'interaction entre cN1 et les récepteurs de N1. La protéine cN1 peut se lier aux récepteurs de la famille DCC/néogénine, mais est incapable de provoquer leur homodimérisation. Non seulement les récepteurs ne sont pas activés, mais la forme clivée de N1 compétitionne avec sa forme complète, agissant comme un antagoniste compétitif. La protéine cN1 est toutefois capable de se lier aux récepteurs de la famille UNC5 et de les activer comme le ferait sa forme complète.

1.3.1.2 Rôles Physiologiques de Nétrine-1

La protéine N1 a été initialement décrite en lien avec son rôle important dans la guidance axonale durant le développement du SNC *in utero*. N1 semble jouer un double rôle, puisqu'elle est capable de provoquer l'attraction ainsi que la répulsion axonale. Par exemple, il a été démontré que les cellules de la plaque du plancher du tube neural expriment N1 sous une forme sécrétée, ce qui a pour effet d'attirer les axones commissuraux [251]. N1 est toutefois également capable de provoquer la répulsion des axones trochléaires moteurs [252]. Dans sa forme clivée, N1 se comporte de façon différente. Il a été observé que cN1 est capable de médier la répulsion axonale mais inhibe l'attraction axonale induite par N1 [250]. Tel qu'il sera expliqué plus bas, cet apparent double rôle de N1 est expliqué par son interaction particulière avec ses différents récepteurs [253].

N1 possède également divers rôles en dehors du SNC. Par exemple, elle est impliquée dans le développement de plusieurs autres organes. N1 est impliquée dans la migration et l'adhésion des cellules épithéliales dans le développement du pancréas et contribue au développement et à la régénérescence des îlots cellulaires [254, 255]. N1 est exprimée par les tissus pulmonaires en développement et contribuerait à réguler le développement des alvéoles [256, 257]. N1 serait également impliquée dans le développement des glandes mammaires [258]. N1 joue également un rôle dans l'angiogénèse. Une étude démontre que N1 induit la prolifération, migration et adhésion des cellules endothéliales et des cellules musculaires lisses vasculaires et stimule l'angiogénèse *in vivo* [259]. N1 peut également favoriser la néovascularisation *in vivo* et renverser le développement de neuropathies et de vasculopathies dans un modèle murin de diabète [260]. N1 aurait aussi un rôle dans la survie cellulaire. Une étude démontre que DCC, un des récepteurs de N1, induit l'apoptose en l'absence de N1, mais inhibe l'apoptose lorsqu'il est lié à son ligand [261]. Une étude subséquente observe un phénomène similaire pour les récepteurs de la famille UNC5 [262]. En somme, les rôles de l'axe N1 dans l'organogénèse et l'homéostasie cellulaire sont multiples.

1.3.1.3 Récepteurs de Nértrine-1

Les principaux récepteurs de N1 peuvent se diviser en deux familles : la famille DCC/néogénine et la famille UNC5. **(Fig.1B)** Cette dernière famille contient les récepteurs UNC5A, UNC5B, UNC5C et UNC5D [263]. La complexité de l'axe N1 repose sur ces récepteurs, qui interagissent entre eux de façon à induire différentes réponses physiologiques de la part des cellules. **(Fig.1C)**

Tel que mentionné précédemment, N1 comporte deux sites de liaison [249]. Lorsque N1 se lie aux récepteurs de la famille DCC/néogénine, elle se lie habituellement à deux récepteurs simultanément. Cela a pour effet de provoquer l'homodimérisation des récepteurs, induisant une réaction d'attraction axonale [263]. N1 peut également se lier simultanément à un récepteur de la famille DCC/néogénine et à un autre récepteur de la famille UNC5. Il en résulte une hétérodimérisation des récepteurs, induisant une réaction de répulsion axonale à longue distance [263]. Enfin, N1 peut se lier aux récepteurs UNC5 et les activer directement, induisant une réaction de répulsion à longue distance [263].

Dans sa forme clivée, N1 se comporte différemment. **(Fig.1D)** Lorsque cN1 se lie aux récepteurs de la famille UNC5, elle est capable d'activer ces récepteurs. Toutefois, lorsqu'elle se lie aux récepteurs de la famille DCC/néogénine, elle est incapable d'induire l'homodimérisation [250]. Ainsi, non seulement cN1 ne possède pas la capacité d'attraction axonale de la protéine complète, mais elle compétitionne avec cette dernière pour les sites de liaison des récepteurs et agit comme un antagoniste compétitif de N1 [250]. Il a été mentionné précédemment que N1 possède un site de liaison spécifique pour les récepteurs de la famille DCC/néogénine sur le domaine V, près du domaine c-terminal, et un site de liaison générique près du domaine VI [249]. Il est possible que la perte du domaine c-terminal perturbe la fonction du site spécifique, ne laissant que le site de liaison générique intact. Ainsi, cN1 pourrait se lier à seulement un récepteur à la fois, expliquant ce phénomène.

En plus des récepteurs des deux familles susmentionnées, N1 possède d'autres récepteurs dont l'utilité est moins bien comprise. Le récepteur adénosine A2b est un récepteur associé à une protéine G qui interagit avec le récepteur DCC pour favoriser

la croissance axonale [264]. La molécule d'adhérence MCAM servirait également de récepteur pour N1 et leur interaction favoriserait l'angiogénèse [265].

1.3.2 Rôles de Nétrine-1 dans l'Inflammation

1.3.2.1 L'influence de l'Axe Nétrine-1 sur le Système Immunitaire

N1 et ses récepteurs sont exprimés par diverses cellules du système immunitaire et l'axe N1 influence la réponse immunitaire de plusieurs façons. Une étude a démontré que N1 est produite par l'endothélium vasculaire et inhibe la migration des leucocytes *in vitro* et *in vivo* en se liant au récepteur UNC5B [266]. Toutefois, il faut noter que cette étude ne faisait pas de distinction entre les différents types de leucocytes. Des études subséquentes ont permis de définir plus en détail l'influence de l'axe N1 sur le système immunitaire. (Tableau 1.)

Des études démontrent que les récepteurs néogénine et adénosine A2b sont exprimés par les neutrophiles [267, 268]. Il a été démontré que N1 inhibe leur migration transépithéliale en agissant sur le récepteur adénosine A2b [268]. De plus, N1 réduit leur production d'IFN- γ induite par l'IL-17 [269].

Il a été démontré *in vitro* que N1 et son récepteur UNC5B sont tous deux exprimés par des macrophages traités avec des lipoprotéines oxydées [270]. Les récepteurs DCC et néogénine sont également exprimés par les macrophages [271, 272]. Sur le plan fonctionnel, N1 réduit leur production de cytokines pro-inflammatoires induite par le LPS et l'IFN- γ [269]. Des études suggèrent que N1 favorise la différenciation des macrophages vers le phénotype M2 [273, 274].

Le rôle de l'axe N1 dans la physiologie microgliale est relativement peu étudiée. Une étude récente suggère que le récepteur UNC5B est exprimé par la microglie et que N1 pourrait inhiber l'activation microgliale [275].

Une étude démontre que les lymphocytes T CD4+ non activés expriment DCC, néogénine, UNC5A et UNC5B [276]. Lors de l'activation, elles augmentent substantiellement leur expression de néogénine et augmentent dans une moindre mesure leur expression d'UNC5A et d'UNC5B [276]. Des études *in vitro* portant sur des cellules de souris démontrent que N1 diminue l'expression des cytokines IL-2, IL-

4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17, IFN- γ et TNF- α par les lymphocytes T CD4+ activés [277]. N1 favorise aussi la migration des lymphocytes T CD4+ activés en agissant via le récepteur néogénine [276].

L'influence de N1 sur les lymphocytes B est mal comprise. Toutefois, il a été démontré que le récepteur DCC est exprimé par les lymphocytes B matures et cette expression est augmentée par l'activation de CD40 [278].

Tableau 1. Expression de Nétrine-1 et de ses Récepteurs par les Cellules Endothéliales Cérébrales (BECs) et les Leucocytes.

	BECs	CD4+	CD8+	B	Macro	Neutro	DC	Microglie
N1	+	?	?	?	+	?	?	?
DCC	-	+	?	+	+	?	?	?
Néogénine	+	+	?	?	+	+	?	?
UNC5A	-	+	?	?	?	?	?	?
UNC5B	+	+	?	?	+	+	?	+
UNC5C	+	-	?	?	?	?	?	?
UNC5D	-	-	?	?	?	?	?	?
A2BAR	?	?	?	?	?	+	?	?

1.3.2.2 L'Influence de l'Axe Nétrine-1 sur l'Inflammation Périphérique

Puisque l'axe N1 a une influence considérable sur le système immunitaire, il devrait être possible de détecter cette influence dans plusieurs contextes inflammatoires. Les propriétés immuno-régulatrices de N1 ont été observées dans plusieurs organes et systèmes différents.

Sur le plan cardiovasculaire, il a été démontré que N1 réduit l'infiltration des neutrophiles et des macrophages dans l'ischémie cardiaque [273]. De plus, la N1 produite par les macrophages contribue au développement des anévrysmes de l'aorte abdominale chez la souris [279]. Il a aussi été observé que N1 et UNC5B sont exprimés par les macrophages dans les régions hypoxiques des plaques d'athérosclérose [270]. N1 inhibe la migration des macrophages en agissant sur le récepteur UNC5B et contribue à leur rétention dans les plaques athérosclérotiques [280]. Un phénomène similaire a été observé dans les tissus adipeux obèses, où N1 favorise la rétention des

macrophages dans les tissus adipeux via le récepteur UNC5B et contribue à l'inflammation locale [281].

Sur le plan respiratoire, il a été observé que l'expression de N1 est diminuée dans les tissus pulmonaires lors de l'inflammation et cette diminution favorise l'entrée de neutrophiles et la production de cytokines dans l'espace alvéolaire [282].

Sur le plan gastrointestinal, une étude démontre que l'expression de N1 est diminuée dans les lésions ischémiques hépatiques. Dans ce contexte, N1 diminue le recrutement de neutrophiles, diminue la production de cytokines pro-inflammatoires et favorise la réparation tissulaire [283]. De plus, N1 est produite par les cellules épithéliales de l'intestin durant l'inflammation aiguë et permet de diminuer l'infiltration des neutrophiles dans le colon [284].

Sur le plan néphrologique, N1 réduit l'infiltration des neutrophiles ainsi que l'expression leucocytaire de COX-2, PGE2 et thromboxane lors de l'ischémie rénale [269]. Une autre étude sur l'ischémie rénale suggère que N1 diminue les dommages tissulaires, l'apoptose, l'infiltration par les monocytes et les macrophages et la production de cytokines et de chimiokines. Cette diminution peut être partiellement renversée par l'administration d'anticorps contre UNC5B [277].

L'influence de l'axe N1 sur l'inflammation périphérique a été démontrée dans plusieurs autres contextes. Dans un modèle murin humanisé, N1 favorise l'infiltration des lymphocytes T dans la peau [276]. Dans un modèle murin d'arthrite rhumatoïde, l'injection d'anticorps monoclonaux contre N1 ou UNC5B diminuent significativement l'inflammation articulaire [285]. Enfin, il a été démontré chez le rat que N1 est exprimé dans les nerfs périphériques inflammés [272].

1.3.2.3 L'Influence de l'Axe Nétrine-1 dans la Neuroinflammation

L'axe N1 a une importante influence sur la réponse inflammatoire dans plusieurs systèmes, et cela inclut le SNC. L'importance de N1 dans la régulation de la BHE a été particulièrement bien démontrée. N1 est produite par les cellules endothéliales de la BHE en réponse à la protéine *Sonic Hedgehog* (Shh), elle-même produite par les astrocytes [286]. La N1 produite dans ce contexte agit sur les cellules endothéliales de

manière autocrine afin de maintenir l'intégrité de la BHE [287]. L'expression de N1 par les cellules endothéliales de la BHE est augmentée dans un contexte inflammatoire [287]. Les cellules endothéliales de la BHE expriment des taux élevés de néogénine et des taux relativement bas de UNC5B et UNC5C, alors que DCC, UNC5A et UNC5D sont indétectables [287]. N1 induit une augmentation de l'expression et de la mobilisation de protéines jonctionnelles par les cellules endothéliales, ce qui se traduit par une perméabilité diminuée de la BHE [287]. N1 réduit la production de CCL2, CXCL8 et IL-6 par les cellules endothéliales inflammées, suggérant un effet anti-inflammatoire [287]. En EAE, un traitement de N1 antérieur à l'immunisation permet de diminuer le score clinique, diminuer l'infiltration cellulaire dans le SNC et diminuer la perméabilisation de la BHE et l'extravasation de protéines sériques dans le SNC [287]. Le rôle de cN1 dans la régulation de la BHE est moins claire. Une étude démontre que N1 diminue la perméabilité des capillaires de la rétine alors que cN1 a l'effet inverse et augmente la perméabilité [288]. À l'heure actuelle, il n'a pas encore été démontré que cN1 a un effet similaire au niveau de la BHE.

En plus de réguler la BHE dans l'homéostasie et l'inflammation, N1 pourrait être impliquée dans la pathogénèse de la SEP. Afin d'explorer cette possibilité, certaines études sont parvenues à des résultats contradictoires concernant les taux sériques de N1 chez les patients atteints de SEP. Une étude suggère qu'ils sont diminués chez les patients atteints de SEP par rapport aux donneurs sains [289]. Une autre étude suggère que les taux sériques de N1 sont similaires entre les patients atteints de SEP et les donneurs sains et ne corrélient pas avec l'activité de la maladie telle qu'évaluée à l'IRM [290]. Quoiqu'il en soit, N1 et cN1 sont toutes deux retrouvées dans les lésions de SEP [250]. De plus, N1 est exprimée par certains macrophages présents dans les lésions [250].

L'implication de l'axe N1 en neuro-inflammation a déjà été observée par des études portant sur des modèles animaux. Chez le rat, N1 et DCC sont surexprimés lors de l'ischémie cérébrale [291]. Une étude utilisant un modèle animal d'hémorragie sous-arachnoïdienne suggère que N1 diminue l'inflammation, l'activation microgliale et l'œdème cérébral dans ce contexte [275]. Enfin, il a été observé que les taux sériques de N1 sont diminués et que l'expression de N1 est diminuée dans le SNC en EAE [289].

2. Hypothèse et Objectifs

La SEP est une maladie auto-immune complexe comprenant plusieurs étapes et impliquant plusieurs types cellulaires. Les lymphocytes T spécifiques contre des antigènes de myéline sont activés dans la périphérie par des APC. Ces lymphocytes acquièrent alors un phénotype pro-inflammatoire ainsi qu'une capacité augmentée à traverser la BHE. Les lymphocytes migrant à travers la BHE dans les lésions sont réactivés par des APC présents dans l'espace périvasculaire. Lymphocytes et APC contribuent tous deux à la réaction inflammatoire, à la démyélinisation et aux dommages aux oligodendrocytes et aux axones.

N1 est une molécule impliquée dans plusieurs processus physiologiques, incluant la régulation de l'inflammation. Les propriétés immuno-régulatrices de N1 ont été observées dans plusieurs contextes et l'influence de l'axe N1 sur les macrophages et les lymphocytes T est bien établie. En neuro-inflammation, l'importance de N1 dans la préservation de la BHE est sans équivoque. Nous en savons toutefois très peu sur l'importance de l'axe N1 dans l'interaction entre les APC et les lymphocytes, processus majeur impliqué dans la pathogénèse de la SEP. Le présent projet cherche à éclaircir cette question.

Hypothèse : Les APC régulent la neuro-inflammation via l'axe N1.

Objectifs :

- 1) Caractériser l'expression de N1 par les APC.
- 2) Évaluer l'influence de N1 sur le fonctionnement des lymphocytes T.
- 3) Étudier l'importance de la production de N1 par les APC dans la neuro-inflammation.

3. Matériel et Méthodes

3.1 Isolation des Cellules Mononucléées Sanguines Périphériques

Les cellules immunitaires requises sont isolées à partir de cellules mononucléées sanguines périphériques (PBMC). Pour obtenir ces cellules, un volume entre 100 et 120 ml de sang veineux est, suite à la signature de formulaires de consentement, prélevé chez des donneurs sains en accord avec le protocole de prélèvement préalablement approuvé par le comité d'éthique de l'institution. Le sang est transféré dans des tubes de 50 mL. Une solution de *Phosphate Buffer Solution* (PBS) contenant 2 mM d'éthylène diamine tétra-acétique (EDTA) est ajoutée au sang afin d'obtenir un volume final de 35 mL. À l'aide d'une pipette de 10 ml, 15 mL de Ficoll-Paque™ (GE HealthCare) sont ajoutés délicatement au fond du tube, sous la solution de sang et de PBS. Le tube est ensuite centrifugé à une force de 800 G pour 30 minutes.

Le Ficoll-Paque a une densité plus élevée que les érythrocytes, mais moindre par rapport au sérum ou aux PBMC. Il en résulte donc que, suite à la centrifugation, un gradient se forme selon la densité. Le Ficoll-Paque s'immiscera entre les érythrocytes et les PBMC, permettant leur récolte. Les cellules sont lavées avec la même solution de PBS/EDTA et centrifugées à une force de 500 G pour 15 minutes. Le surnageant est retiré et les culots des différents tubes d'un même donneur sont combinés. Les cellules sont à nouveau lavées avec PBS/EDTA et centrifugées à une force de 200 G pour 10 minutes. Cette force de centrifugation plus basse fait en sorte que les thrombocytes demeurent dans le surnageant. Le surnageant est retiré, les cellules sont resuspendues dans la solution de PBS/EDTA et sont comptées à l'aide d'un hémacytomètre.

3.2 Isolation des Monocytes et Lymphocytes

Les monocytes CD14+ ou lymphocytes T CD4+ ou CD8+ sont resuspendus dans une solution de tampon MACS qui contient PBS, 2 mM EDTA et 0,5% FBS. Les

cellules sont alors à une concentration de 80 μL par 10^7 de cellules. Les cellules d'intérêt sont ensuite extraites des PBMC par séparation magnétique. Pour ce faire, des billes magnétiques à sélection positives liant les cellules exprimant CD14 (Miltenyi Biotec, #130-050-201), CD4 (Miltenyi Biotec, #130-045-101) ou CD8 (Miltenyi Biotec, #130-045-201) sont ajoutées aux cellules en une quantité de 20 μL par 10^7 de cellules. Les cellules sont incubées avec les billes à 4°C pour 15 minutes. Les cellules sont ensuite lavées avec 1-2 mL de tampon MACS par 10^7 de cellules et centrifugées à une force de 500 G pour 15 minutes.

Pour la séparation, des colonnes de type LS (Miltenyi Biotec, #130-042-401) sont insérées dans des cadres aimantés conçus à cette fin. La colonne est préparée en laissant couler 3 mL de tampon MACS à travers la colonne. Les cellules sont resuspendues dans 3 mL de tampon MACS et sont ajoutées à la colonne. Les cellules d'intérêt sont liées à des billes magnétiques et resteront captives de la colonne du fait du champ magnétique, alors que les autres cellules traversent complètement. Une fois que la solution de cellules a complètement traversé la colonne, 3 lavages de 3 mL de tampon MACS sont faits, laissant la solution s'écouler complètement entre chaque lavage. Après les 3 lavages, les colonnes sont retirées des aimants et insérées dans des tubes de 15 mL. 5 mL de tampon MACS est ajouté à la colonne et le volume est rapidement comprimé à travers la colonne à l'aide d'un piston. Cette solution contient les cellules d'intérêt, qui ont pu traverser la colonne après que celle-ci ait été retirée du champ magnétique.

3.3 Différentiation des Cellules Dendritiques

Les cellules CD14⁺ extraites magnétiquement sont resuspendues à une concentration de 10^6 cellules par mL dans une solution de RPMI complet (RPMI 1640 [Multicell, #350-000-CL], FBS 10%, Pen/Strep 1%, Glutamax 1% [Thermo Fisher Scientific, #35050-061], HEPES 0,01 M [Multicell, #330-050-EL], Pyruvate de Sodium 1 mM [Multicell, #600-110-EL], *Non-Essential Amino Acids* 1% [Sigma, #M7145] et β -mercapthoéthanol 50 μM). La suspension cellulaire est supplémentée de 50 ng/mL de GM-CSF (PeproTech, #300-03) et de 10 ng/mL d'IL-4 (R&D Systems, #204-IL). La

suspension est mise dans des plaques à 6 puits, 2 mL par puit. Les cellules sont incubées à 37°C.

À jour 3, les cytokines sont renouvelées. Les cellules sont retirées de l'incubateur, la plaque est tenue à un angle de 45° et 1 mL de la solution est délicatement soustraite du sommet de chaque puit. On remplace le milieu retiré en ajoutant 1 mL d'une solution de RPMI complet préalablement chauffée à 37°C contenant 100 ng/mL de GM-CSF et 20 ng/mL d'IL-4 (concentrations finales approximatives de 50 ng/mL de GM-CSF et 10 ng/mL d'IL-4). Les cellules sont remises dans l'incubateur à 37°C.

À jour 5, les iDC peuvent être recueillies. À l'aide d'une pipette 1 mL, le milieu est vigoureusement rejeté sur le fond du puit plusieurs fois afin de déloger les DC adhérentes. Le milieu est prélevé et ajouté à un tube et le lavage du puit est répété de la même manière avec 1 mL de PBS. Ce PBS contenant les dernières cellules est ajouté au tube. Les cellules de tous les puits d'un même donneur sont regroupées dans un tube de 1,5 mL. Les cellules sont centrifugées, le surnageant est retiré et le tube contenant le culot cellulaire est entreposé à -80°C.

À jour 5, les cellules restantes en culture peuvent être stimulées pour obtenir des mDC. Les cellules sont retirées de l'incubateur et 1 mL de milieu est retiré par puit de la même façon qu'au jour 3. On ajoute à chaque puit 1 mL d'une solution de RPMI complet préalablement chauffée à 37°C contenant 100 ng/mL de GM-CSF, 20 ng/mL d'IL-4 et 200 ng/mL de LPS (Sigma, #L4391) (concentrations finales approximatives de 50 ng/mL de GM-CSF, 10 ng/mL d'IL-4 et 100 ng/mL de LPS). Les cellules sont remises dans l'incubateur à 37°C.

À jour 7, les mDC sont recueillies. Elles sont recueillies de la même façon que les cellules immatures, mais la maturation des DC les amène à se détacher spontanément. Ainsi, la tâche est plus facile à cette étape et des lavages moins rigoureux peuvent être utilisés. Les cellules sont mises dans des tubes de 1,5 mL, le surnageant est retiré et les tubes contenant les culots sont entreposés à -80°C.

3.4 Différentiation des Macrophages M1 et M2

Les cellules CD14⁺ extraites magnétiquement sont resuspendues à une concentration de 10⁶ de cellules par mL dans une solution de milieu R10 (RPMI 1640, 10% FBS, 1% Pen/Strep, 1% Glutamax). La suspension cellulaire est supplémentée avec 25 ng/mL de M-CSF (R&D Systems, #216-MC). Les cellules sont mises dans des plaques à 6 puits, 2 mL par puit. Les cellules sont incubées à 37°C.

À jour 5, les macrophages peuvent être différenciés en macrophages M1 ou M2. Pour les macrophages M1, 200 µL d'une solution de R10 contenant 200 ng/mL d'interféron-γ sont directement ajoutés à chaque puit (concentration finale approximative de 20 ng/mL d'interféron-γ) et les cellules sont remises à incuber pour 1 heure. Ensuite, 100 ng/mL de LPS sont ajoutés directement à chaque puits. La plaque est légèrement agitée pour assurer la dispersion des cytokines et remise à incuber à 37°C. Pour les macrophages M2, 200 µL d'une solution de R10 contenant 200 ng/mL d'IL-4 et 200 ng/mL d'IL-13 (R&D Systems, #213-ILB) sont directement ajoutés à chaque puit (concentration finale approximative de 20 ng/mL d'IL-4 et de 20 ng/mL d'IL-13). Les cellules sont ensuite remises à incuber à 37°C.

À jour 7, les macrophages sont recueillis. Les cellules sont soigneusement décollées des puits à l'aide d'un grattoir, puis le milieu est vigoureusement rejeté sur le fond du puit afin de le laver. Le milieu contenant les cellules est transféré à un tube et les puits sont lavés avec 1 mL de PBS chacun. Les cellules sont centrifugées puis transférées à un tube de 1,5 mL. Les cellules sont centrifugées, le surnageant est retiré et les tubes contenant les culots cellulaires sont conservés à -80°C.

3.5 La Réaction en Chaîne par Polymérase Quantitative (qPCR)

Pour mesurer l'expression d'ARN de Nétrine-1 par les DC et macrophages, la réaction en chaîne par polymérase quantitative (qPCR) est effectuée. D'abord, de l'eau sans RNAase est mise à chauffer à 56°C. Les échantillons sont récupérés et les culots sont resuspendus dans 1 ml de Trizol (Thermo Fisher Scientific, #15596018). 200 µL de chloroforme à -20°C sont ajoutés à chaque échantillon et les tubes sont vigoureusement agités. Les échantillons sont mis à centrifuger à 4°C à une force de

16000 G pendant 15 minutes. Ensuite, la phase aqueuse des échantillons est transférée à de nouveaux tubes de 1,5 mL. 700 µL d'éthanol sont ajoutés à cette dernière. 700 µL de cette solution est ajouté à une colonne de purification d'ARN (Qiagen, #1026497) et la colonne est mise à centrifuger pour 20 secondes à une force de 9000 G. Ce qui s'est écoulé de la colonne est jeté, et le restant de la solution est ajouté à la colonne avant d'être centrifugée à nouveau. 350 µL de tampon RW1 sont ajoutés à chaque colonne, les colonnes sont centrifugées 20 secondes et le liquide qui s'est écoulé de la colonne est jeté. Cette étape est répétée une deuxième fois. 500 µL de tampon RPE sont ajoutés à la colonne, les colonnes sont centrifugées 20 secondes puis le liquide est jeté. 500 µL d'éthanol 80% sont ensuite ajoutés, les colonnes sont centrifugées 2 minutes et le liquide jeté. Sans rien ajouter, la colonne est de nouveau mise à centrifuger, pour une durée de 5 minutes afin d'extraire toutes traces de liquide restantes. Les colonnes sont transférées sur de nouveaux tubes de 1,5 mL et 20 µL de l'eau sans RNAase préchauffée est ajoutée directement à la membrane. Les colonnes posées dans les tubes de 1,5 mL sont mises à centrifuger 1 minute. L'échantillon d'ARN purifié se retrouve dans le tube de 1,5 mL à la fin de cette étape. L'échantillon est mis sur glace et sa concentration est mesurée grâce à un spectrophotomètre.

De l'ADN cyclique (cDNA) est ensuite généré à partir des échantillons d'ARN en utilisant un kit commercial (Qiagen, #205313). 500 ng d'ARN est déposé dans des tubes à PCR (Sarstedt, #72.985.002) et de l'eau sans RNAase est ajouté afin d'obtenir un volume total de 12 µL. 2 µL du tampon *Wipeout* est ajouté à chaque tube et les tubes sont incubés pendant 2 minutes à 42°C avant d'être mis sur la glace. Chaque tube reçoit ensuite 4 µL de tampon RT, 1 µL de reverse transcriptase et 1 µL du *primer mix*. Les tubes sont ensuite incubés 15 minutes à 42°C, puis 3 minutes à 95°C avant d'être mis sur la glace. Ces tubes contiennent le cDNA dérivé des échantillons d'ARN.

Pour l'analyse qualitative en tant que telle, deux principaux mélanges sont créés : un mélange pour le gène de contrôle, 18S, et un autre pour le gène d'intérêt, Nétrine-1. Le mélange 18S contient, pour chaque échantillon, 16,875 µL d'eau, 18,75 de mélange à PCR Taqman (Thermo Fisher Scientific, #4324020), ainsi que 0,1875 µL des amorces *Forward*, des amorces *Reverse* et du marqueur *VIC*. Le mélange pour Nétrine-1 contient, pour chaque échantillon, 15,375 µL d'eau, 18,75 µL du mélange à

PCR Taqman et 1,875 μL de l'amorce pour Nétrine-1 (Thermo Fisher Scientific, #Hs00924151_m1). Pour chaque échantillon, 36 μL du mélange 18S sont déposés dans un puit d'une plaque à 96 puits avec fond en V. Pour chaque échantillon, 36 μL du mélange Nétrine-1 sont déposés dans un puit adjacent. Pour chaque échantillon, 2 μL de cDNA est déposé dans un puit 18S et 2 μL sont déposés dans un puit Nétrine-1. Le contenu des puits est transféré à une plaque 384 puits (Sarstedt, #72.1984.202), 10 μL par puit en triplicat. Une pellicule plastique (Thermo Fisher Scientific, #4311971) est appliquée à la surface des puits afin de les sceller. La plaque est ensuite analys e avec un instrument QuantStudioTM 7 Flex. Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel GraphPadTM PRISM 6.0 (GraphPadTM Software).

3.5 Immunobuvardage

L'expression de la protéine Nétrine-1 dans les échantillons est mesurée par immunobuvardage. Les protéines sont d'abord extraites des culots cellulaires avec un tampon RIPA (Thermo Fisher Scientific, #89900) incluant 1% d'un inhibiteur de protéase (Thermo Fisher Scientific, #78415). Les protéines sont ensuite mesurées avec un ensemble de quantification protéique BCA (Thermo Fisher Scientific, #23227).

Un gel à base d'acrylamide 30% (Bio-Rad, #161-0156) est produit pour effectuer une électrophorèse de gel de polyacrylamide avec dodécyl-sulfate de sodium (SDS-PAGE). Pour chaque échantillon, 30 μg de protéines sont ajoutés à un tube de 1,5 mL et du tampon RIPA y est ajouté pour obtenir un volume final de 20 μL .   chaque échantillon sont ajoutés 20 μL de tampon Laemmli (Bio-Rad, #161-0737). 14 μL d'une échelle de protéines pré-colorées de type KaleidoscopeTM (Bio-Rad, #161-0375) sont introduits dans le premier puit de chaque gel. Dans le puit adjacent, 10 ng de protéine Nétrine-1 recombinante (R&D Systems, 6419-N1/CF) sont introduits afin de servir de contrôle positif. Occasionnellement, il y a également 30 μg de protéines de cellules endothéliales cérébrales humaines inflammées, qui constituent un autre contrôle positif. Les échantillons, qui ont à cette étape un volume de 40 μL , sont entièrement insérés dans les puits des gels, conservant un puit vide entre chaque échantillon afin

d'éviter le déversement d'un échantillon vers un autre. L'électrophorèse est faite à une tension de 120 V et dure approximativement 90 minutes.

Après l'électrophorèse, les gels sont soigneusement retirés de leur cadre. Le transfert des protéines est fait avec une membrane de nitrocellulose (Bio-Rad, #1620115). Les membranes ne sont pas activées avec du méthanol préalablement au transfert, mais le tampon de transfert en contient. Le transfert se fait à une tension de 100 V et dure 1 heure.

Après le transfert, les membranes sont soigneusement retirées et sont immergées dans une solution comprenant 5% de protéine de lait, ce qui permet de faire le blocage. Les membranes sont ensuite incubées dans une solution avec 5% de protéine de lait et un anticorps *Rabbit α Human* anti-Nétrine-1 (Abcam, ab126729) à une concentration 1/1000. L'incubation se fait toute la nuit. Les membranes subissent ensuite 3 lavages de 5 minutes dans une solution qui contient 1% de tween. Les membranes sont ensuite incubées dans une solution avec 5% de protéine de lait et un anticorps HRP *Goat α Rabbit* (Jackson ImmunoResearch, #111-035-144) à une concentration de 1/5000. Les membranes sont ainsi incubées pour une période de trente minutes, suite à quoi elles subissent 5 lavages de 5 minutes avec une solution contenant 1% de tween. Les membranes sont retirées de cette solution, égouttées et déposées face vers le haut. Les deux réactifs nécessaires à la réaction d'électrochimiluminescence (ECL) (PerkinElmer, #ORT2755) sont mélangés et appliqués sur la surface des membranes. Les membranes restent en contact avec la solution pour une minute, après quoi elles sont égouttées, placées dans un film transparent et analysées par le système d'imagerie ChemiDoc™ MP. La luminescence émise par les bandes sur les membranes est captée et accumulée sur une période de 10 minutes.

Les membranes sont transitoirement immergées dans une solution contenant 1% de tween avant d'être réincubées pour quantifier l'actine, la protéine de contrôle. Ce processus implique des étapes analogues à celles employées pour quantifier la protéine Nétrine-1. L'anticorps primaire est un anticorps *Mouse α Human* anti-actine (Sigma, #A5441) et est employé à une concentration de 1/200 000. L'anticorps secondaire est un anticorps HRP *Rabbit α Mouse* (Dako, #P0260) et est employé à

une concentration de 1/5000. Les membranes subissent le même nombre de lavages et sont également en contact avec les réactifs d'ECL pour une minute. Toutefois, les membranes ne sont exposées au ChemiDoc que pour une période de 10 secondes. L'intensité des bandes est mesurée avec le logiciel ImageJ 1.51j8 [292] et les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel GraphPad™ PRISM 6.0 (GraphPad™ Software).

3.6 Marquage *Carboxyfluorescein Succinimidyl Ester* (CFSE)

Certains lymphocytes CD4+ et CD8+ sont marqués par le CFSE afin d'évaluer leur prolifération. Pour ce faire, les cellules sont resuspendues à une concentration de 5 à 10 millions de cellules par mL dans une solution préchauffée à 37°C de RPMI 1640 ne contenant aucun sérum. Le marqueur CFSE est ajouté à une concentration de 1/2000. La suspension est incubée pendant 10 minutes à 37°C en étant constamment agitée. Pour interrompre la réaction entre les cellules et le marqueur, une solution de RPMI 1640 contenant 10% de FBS est ajoutée aux cellules. Le volume ajouté est égal à la moitié de la solution cellulaire. Les cellules sont ensuite placées dans la noirceur totale pour une durée de 5 minutes. Le tube contenant les cellules est ensuite rempli de PBS froid et est centrifugé à une force de 500 G pour 15 minutes. Le surnageant est enlevé, le culot est resuspendu dans du PBS et reçoit un deuxième lavage. Les cellules sont ensuite comptées avec un hémacytomètre.

3.7 Activation et Polarisation Lymphocytaire

Une solution à base de PBS contenant 2,5 µg/mL de l'anticorps anti-CD3 OKT-3 (eBioscience, #16-0037-85) est faite. Des plaques de 6 puits sont préparées dépendamment du nombre de puits désirés. 1 ml de solution d'OKT-3 est ajoutée dans chacun des puits à être utilisés. Les plaques sont mises à incuber à 37°C pour au moins 1 heure.

Les lymphocytes sont resuspendus à une concentration de $0,5 \times 10^6$ cellules par mL dans une solution de X-Vivo 15™ (Lonza, #04-418Q) supplémentée de 1% de Pen/Strep et 1% de Glutamax. Un anticorps anti-CD28 (BD Biosciences, #555725) est

ajouté à la solution à une concentration de 2 µg/mL. Pour les lymphocytes T CD4+, les cytokines et anticorps requis à la polarisation sont également ajoutés, tel que décrit dans le tableau 2. Les suspensions cellulaires sont séparées en deux. Une des moitiés est traitée avec 100 ng/mL de Nétrine-1 recombinante (R&D Systems, 6419-N1/CF). Les plaques préalablement préparées sont retirées de l'incubateur. La solution d'OKT-3 est aspirée et 2 mL de suspension cellulaire est déposée dans chaque puit. Les plaques sont incubées à 37°C et retirées au temps indiqué pour chaque expérience.

Tableau 2. Conditions de Polarisation des Lymphocytes T CD4+.

Polarisation	Cytokine ou Anticorps	Concentration finale	Fournisseur	# de Catalogue
TH1	Anti-IL-4	5 µg/mL	Bio X Cell	BE0240
	IL-12	10 ng/mL	R&D Systems	219-IL
TH17	Anti-IL-4	5 µg/mL	Bio X Cell	BE0240
	Anti-IFN-γ	5 µg/mL	Bio X Cell	BE0235
	IL-23	25 ng/mL	R&D Systems	1290-IL

3.8 Marquage Cellulaire et Cytométrie de Flux

Les lymphocytes utilisés pour le marquage intracellulaire des cytokines doivent être préalablement activés. Afin d'obtenir un signal clair, la production de cytokines est stimulée et la libération de protéines par l'appareil de Golgi est inhibée. Pour ce faire, les lymphocytes sont recueillis des plaques et divisés dans une plaque de 96 puits à fond en V. Habituellement, 10⁶ de cellules sont placées par échantillon ou puit. Une solution de stimulation est faite à partir de X-Vivo 15™ (Lonza, #04-418Q) supplémenté de 1% de Pen/Strep et 1% de Glutamax. On y ajoute 20 ng/mL de Phorbol 12-myristate 13-acétate (PMA) (Sigma, #P8139), 1 µg/mL d'ionomycine (Sigma, #I9657) et 2 µg/mL de bréfeldine A. Les cellules de chacun des puits sont resuspendues dans 200 µL de la solution de stimulation et transférées dans des plaques à fond en U. Les plaques sont mises à incuber à 37°C pendant 5 heures.

Les lymphocytes stimulés ou ceux utilisés pour le marquage extracellulaire sont marqués pour la cytométrie de flux. Les cellules sont lavées avec du PBS et distribuées dans une plaque à 96 puits en V. Les cellules sont resuspendues dans une solution de PBS contenant un marqueur LIVE/DEAD™ (Thermo Fisher Scientific, #L34966), permettant d'identifier les cellules mortes. Les cellules sont incubées dans le noir à 4°C pour 20 minutes. Les cellules sont lavées avec du PBS. Les récepteurs FC sont ensuite bloqués en resuspendant les cellules de chaque puit dans 20 µL d'IgG murins (Invitrogen, #10400C). Les cellules sont incubées dans le noir à 4°C pour 15 minutes. Les cellules sont lavées et le marquage extracellulaire est fait en resuspendant les cellules dans 50 µL d'une solution à base de PBS contenant tous les anticorps nécessaires au marquage extracellulaire. Les anticorps utilisés pour le marquage extracellulaire sont décrits dans le tableau 3. Les cellules sont lavées une fois avec du PBS puis incubées dans le noir à 4°C pour 20 minutes. Les cellules sont lavées avec du PBS, puis lavées encore une fois avec une solution tampon pour cytométrie de flux qui est à base de PBS et contient 1% de FBS et 0,1% d'azide de sodium. Les cellules utilisées uniquement pour la mesure des marqueurs extracellulaires sont alors fixées dans 100 µL d'une solution de fixation (BD Biosciences, #554655). Elles sont incubées dans le noir à 4°C pour 20 minutes. Elles sont lavées avec la solution tampon, resuspendues dans 200 µL de la solution tampon et conservées à 4°C.

Les cellules utilisées pour le marquage intracellulaire sont plutôt resuspendues dans 100 µL d'une solution de fixation et de perméabilisation (BD Biosciences, #554722). Elles sont incubées dans le noir à 4°C pour 20 minutes. Elles sont lavées deux fois avec une solution de lavage et de perméabilisation nommée Perm/Wash™ (BD Biosciences, #554723). Pour le marquage intracellulaire, les cellules sont resuspendues dans une solution à base de Perm/Wash contenant les anticorps nécessaires. Les anticorps utilisés pour le marquage intracellulaire sont décrits dans le tableau 4. Les cellules sont incubées dans le noir à 4°C pour 30 minutes. Elles sont lavées à deux reprises avec la solution Perm/Wash.

Toutes les cellules marquées sont resuspendues dans 300 µL de la solution tampon de cytométrie et placées dans des microtubes. Les cellules sont alors analysées avec un cytomètre de flux (LSR II, BD Biosciences) et le logiciel FACSDiva.

Les analyses statistiques sont effectuées avec le logiciel GraphPad™ PRISM 6.0 (GraphPad™ Software).

Tableau 3. Anticorps pour le Marquage Extracellulaire.

Cible	Fluorochrome	Volume / 50 µL	Fournisseur	# de Catalogue
CD3	BV605	2 µL	BioLegend	317332
CD3	PB	2 µL	BD	558117
CD4	PE	5 µL	BD	555347
CD8	APC-Cy7	5 µL	BD	557834
CD8	PB	5 µL	BD	558207
CD14	AF700	2 µL	BD	557923
CD31/PECAM	AF700	5 µL	R&D Systems	FAB3567N
CD49d/VLA-4	BV605	1 µL	BioLegend	304324
CD80	PE	5 µL	BD	557227
CD83	PE-Cy7	2 µL	BD	561132
CD86	APC	5 µL	BD	555660
CD146/MCAM	APC	5 µL	Miltenyi	130-092-849
CD166/ALCAM	BV786	5 µL	BD	564939
CD166/ALCAM	PE	5 µL	BD	559263
CD209	PERCP	5 µL	BD	558263
HLA-DR	V450	5 µL	BD	561359

3.8 Immunohistochimie

Les marquages d'immunohistochimie sont faits à partir de tissus cérébraux et spinaux murins générés via une EAE primaire. Un score clinique de 0 à 5 a été attribué quotidiennement aux différents animaux tel que précédemment décrit [212]. Les animaux ont été sacrifiés à différents stades de la maladie : Apparition (24 à 48 heures après le début des symptômes, score clinique de 2), pic (score clinique de 3,5 à 4),

Tableau 4. Anticorps pour le Marquage Intracellulaire.

Cible	Fluorochrome	Volume / 50 µL	Fournisseur	# de Catalogue
GM-CSF	BV421	5 µL	BD	562930
Granzyme B	APC	5 µL	Invitrogen	MHGB05
IFN-γ	AF700	0,2 µL	BD	557995
IL-17	AF488	5 µL	eBioscience	53-7179-42
Perforin	PE	10 µL	Abcam	Ab47226
TNF-α	PE-Cy7	2 µL	BD	557647

Tableau 5. Isotypes pour la Cytométrie de Flux.

Fluorochrome	Isotype	Fournisseur	# de Catalogue
AF488	IgG1	BD	557702
AF700	IgG1	BD	557882
AF700	IgG2A	BD	557880
APC	IgG1	BD	555751
BV421	Rt IgG2A	BD	562602
BV605	IgG1	BioLegend	400162
BV786	IgG1	BD	563330
PE	IgG1	BD	554680
PE-Cy7	IgG1	BD	557646
PERCP	IgG2B	BD	550927

rémission (score clinique retournant à 3 après le pic) et chronique (30 jours après l'immunisation, score clinique approximatif de 2 à 2,5). L'EAE et les sacrifices ont été faits en accord avec le protocole approuvé par le comité d'éthique de l'institution. Les organes furent placés dans l'OCT et congelés à -80°C. Les blocs de tissus furent découpés avec un cryostat, formant des sections de 10 µm d'épaisseur. Les sections furent montées sur des lames qui furent également congelées à -80°C.

Les sections sont immergées dans l'acétone pour 10 minutes, puis dans l'éthanol 70% pour 5 minutes. Les sections sont lavées avec du PBS. Un Dako-pen (Dako, #S2002) est utilisé pour délimiter les différentes sections. Les lames sont ensuite lavées avec du PBS contenant 1% de tween, ou PBST. La biotine endogène présente dans les tissus est bloquée en utilisant un ensemble commercial conçu à cet effet (Thermo Fisher Scientific, #E21390). Les sections sont ensuite bloquées en appliquant à leur surface une solution à base de PBS comprenant 10% de sérum *Donkey* et en les incubant pour 30 minutes à la température de la pièce.

Les marquages ont été faits pour deux combinaisons possibles : Nétrine-1 et CD11c, marqueur des DC, ou Nétrine-1 et Iba-1, marqueur des macrophages et microglie. Les solutions d'anticorps primaires sont faites dans une solution de PBS avec 3% de sérum *Donkey*. Les anticorps utilisés sont : *Rat α Mouse*, anti-Nétrine 1, 1/50 (R&D Systems, MAB1109). Biotine *α Mouse*, anti-CD11c, 1/200 (BioLegend, #117304). *Rabbit α Mouse*, Anti-Iba-1, 1/100 (Wako, #019-19741). Le contrôle négatif (une section sur 3 par lame) n'est pas recouvert d'une solution d'anticorps à cette étape, mais plutôt d'une solution de PBS avec 3% de sérum *Donkey*. Les sections sont incubées pour une durée d'une heure à la température de la pièce. Les lames sont lavées 7 fois avec du PBST. La solution d'anticorps secondaires est préparée dans du PBS. Les anticorps utilisés sont : *Donkey α Rat Cy3*, 1/300 (Jackson ImmunoResearch, #712-166-153). Streptavidine AF488, 1/750 (Jackson ImmunoResearch, #016-540-084). *Donkey α Rabbit* AF488, 1/200 (Thermo Fisher Scientific, #A21206). Avant d'être appliquée, la solution d'anticorps est centrifugée à 9300 G pour 3 minutes afin d'enlever les précipités. Les sections sont incubées avec les anticorps secondaires pour une durée de 40 minutes à la température de la pièce.

Les sections sont lavées 3 fois avec du PBST, puis elles sont immergées dans une solution de PBS avec 1% de Triton-X. Les sections sont lavées 3 fois avec du PBST à nouveau. Pour le montage des lames, le marqueur nucléaire TOPRO-3 (Thermo Fisher Scientific, #T3605) est ajouté à du Mowiol à une concentration de 1/300. Cette solution de Mowiol est appliquée sur les lames et elles sont recouvertes d'une lamelle. Les lames sont laissées à sécher pour au moins une nuit, dans l'ombre à 4°C.

4. Résultats

4.1 Les cellules dendritiques augmentent leur expression de Nétrine-1 suite à leur maturation

Diverses études suggèrent que N1 peut influencer la fonction des lymphocytes T autant chez la souris [277] que chez l'humain [276]. Toutefois, ces études ne nous éclairent pas quant à l'origine de N1 dans un contexte inflammatoire. Puisque les APC, tout particulièrement les DC, sont en contact étroit avec les lymphocytes T durant leur activation, il est raisonnable de soupçonner que les DC pourraient produire N1 afin d'influencer la fonction des lymphocytes T. L'expression de N1 par les DC n'est pas décrite dans la littérature et caractériser cette expression pourrait nous aider à comprendre le rôle de N1 dans la régulation de l'inflammation.

Pour ce faire, nous avons besoin de générer des DC en quantités suffisantes. Il est difficile d'obtenir des DC d'origine myéloïde à partir du sang de donneurs sains, puisque les DC représentent moins de 1% des leucocytes en circulation [293]. Les études portant sur les DC utilisent depuis longtemps des DC dérivées de monocytes traités avec GM-CSF et IL-4 [294]. Les DC ainsi obtenus sont toutefois immatures. Lorsque les DC capturent un antigène dans un contexte inflammatoire, ils adoptent un phénotype mature et présentent une capacité augmentée d'activation lymphocytaire. Si N1 est exprimé par les DC, il est possible que la maturation altère cette expression. Le LPS est couramment utilisé pour induire la maturation des DC générés *in vitro* [295].

Pour générer les DC nécessaires aux expériences subséquentes, des monocytes furent extraits des PBMC de donneurs sains en utilisant des billes magnétiques. Ces cellules furent traitées avec 50 ng/mL de GM-CSF et 10 ng/mL d'IL-4. Les iDC furent récoltées au jour 5, les autres cellules furent traitées avec 100 ng/mL de LPS. Les mDC furent récoltées au jour 7. **(Fig.2)**

Nous avons validé le processus de différenciation en analysant les cellules par cytométrie de flux. Les monocytes utilisés sont extraits en utilisant des billes de sélection positive pour CD14+, ces cellules expriment donc CD14. Suite à leur différenciation, les cellules en culture ont perdu leur expression de CD14, suggérant un

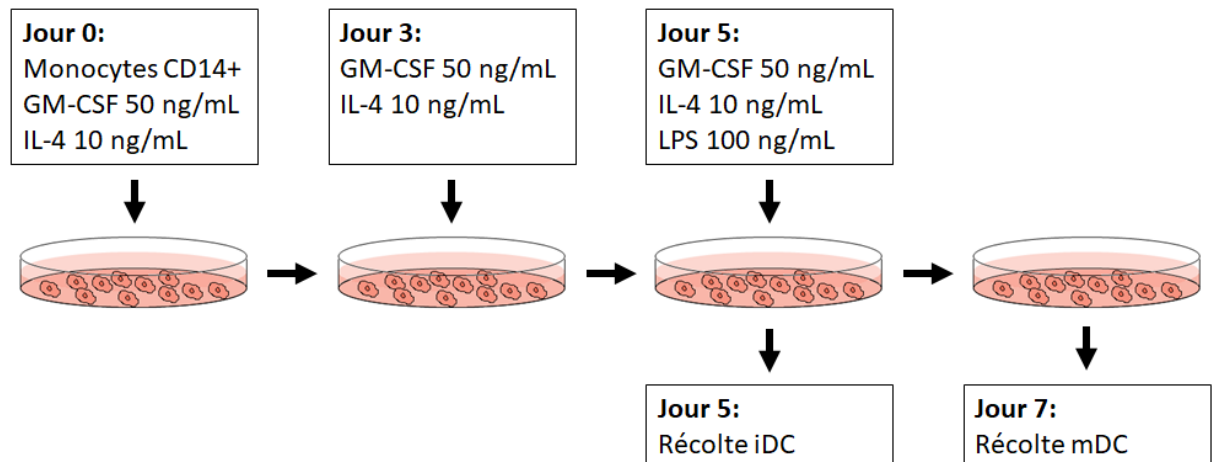


Figure 2. Protocole de différenciation des cellules dendritiques.

Les cellules mononucléées périphériques sanguines sont extraites par Ficoll et les monocytes CD14+ sont extraits avec des billes magnétiques à sélection positive. Les cellules sont mises en culture à une concentration de 1 million par mL, 2 mL par puit. On y ajoute 50 ng/mL de GM-CSF et 10 ng/mL d'IL-4. Les cytokines sont renouvelées au jour 3. Au jour 5, les cellules dendritiques immatures sont recueillies. Pour la maturation des cellules dendritiques, les cytokines sont renouvelées et du LPS à 100 ng/mL est ajouté. Les cellules dendritiques matures sont recueillies au jour 7. Les cellules recueillies sont mises en culot et conservées à -80°C.

changement de phénotype. De plus, ils expriment HLA-DR, suggérant une capacité de présentation antigénique. Ces résultats suggèrent que les cellules obtenues sont des DC. **(Fig.3B)** Suite à l'exposition au LPS, les DC augmentent leur expression de CD80, CD83 et CD86 par rapport au jour 5. Cela suggère que les DC obtenues à jour 7 ont un phénotype mature. **(Fig.3C)**

Pour caractériser l'expression de N1 par les DC, nous avons d'abord quantifié l'expression d'ARN N1 par qPCR. **(Fig.4)** L'ARN fut extrait des échantillons de iDC et mDC générés en culture ainsi que de monocytes *ex vivo*. Le gène 18S fut utilisé comme gène de contrôle, et l'expression relative de N1 par rapport à 18S fut calculée. La valeur moyenne obtenue est de 0 pour les monocytes, de 0,0000288 pour les iDC et de 0,0008258 pour les mDC. En comparant les iDC aux mDC d'un même donneur, il est noté que l'expression d'ARN de N1 des mDC est augmentée de façon statistiquement significative par rapport à celle des iDC, avec une valeur p de 0,0002 (Test de Student apparié par ratio). Les DC augmentent donc substantiellement leur expression d'ARN de N1 suite à leur maturation, alors que les monocytes n'en expriment pas.

Il est primordial de confirmer que cette régulation à la hausse de l'ARN de N1 se reflète dans l'expression de la protéine elle-même. En utilisant la technique d'immunobuvardage, nous avons mesuré l'expression des monocytes, iDC et mDC. L'intensité de la bande de N1 obtenue fut comparée à celle de l'actine, protéine de contrôle. On ne note pas de bande notable chez les monocytes et iDC, mais on en observe une chez les mDC. **(Fig.5A)** Pour comparer quantitativement l'expression de la protéine N1 entre les iDC et les mDC, nous avons calculé le ratio entre l'intensité relative de la bande N1 et celle de la bande de l'actine. Les valeurs moyennes obtenues sont de 0,0141402 pour les iDC et de 0,3141751 pour les mDC. Il s'agit d'une différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,0278 (Test de Student apparié). Les résultats de l'analyse par immunobuvardage concordent donc avec ceux de l'analyse par qPCR. Ces résultats suggèrent conjointement que l'expression de N1 augmente significativement avec la maturation des DC alors que N1 n'est pas exprimée par les monocytes.

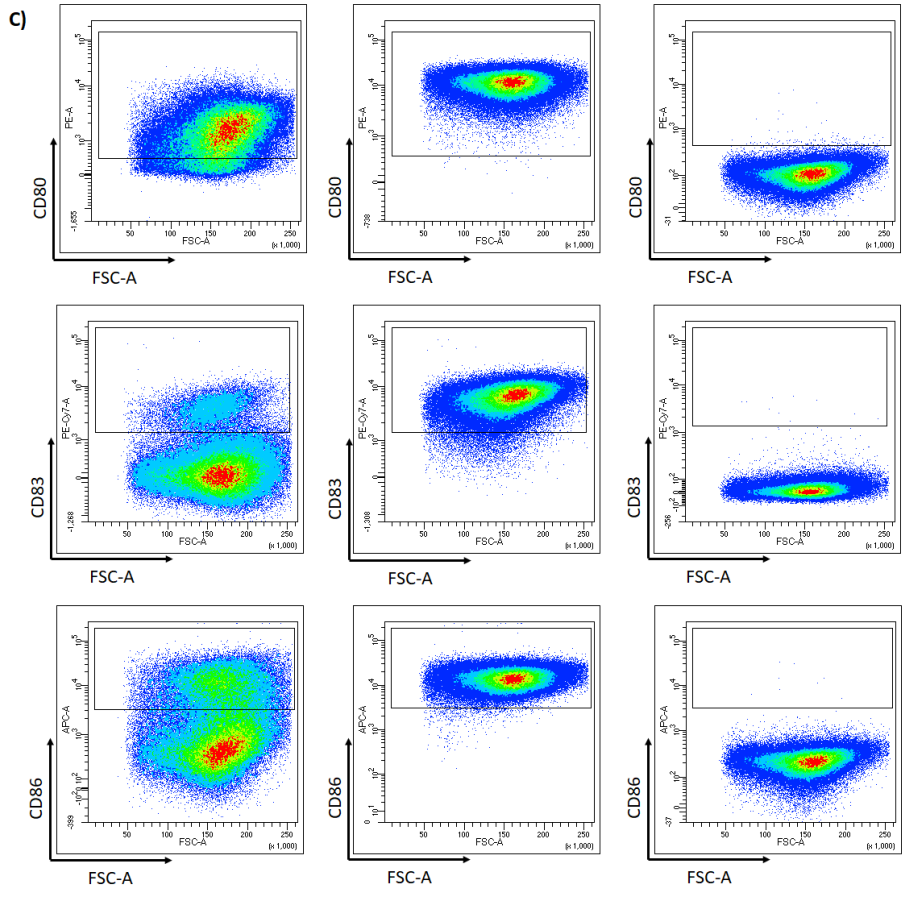
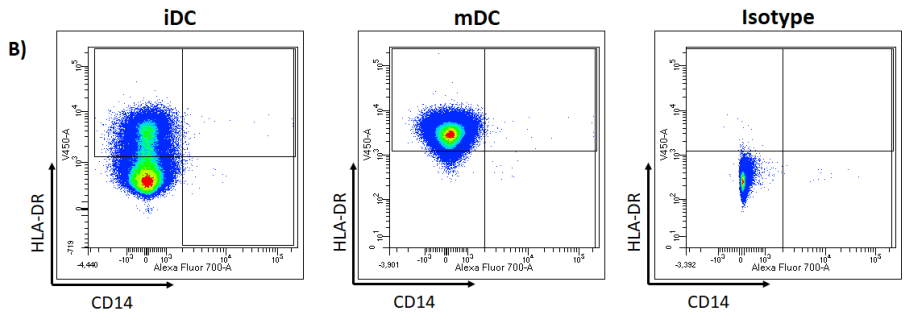
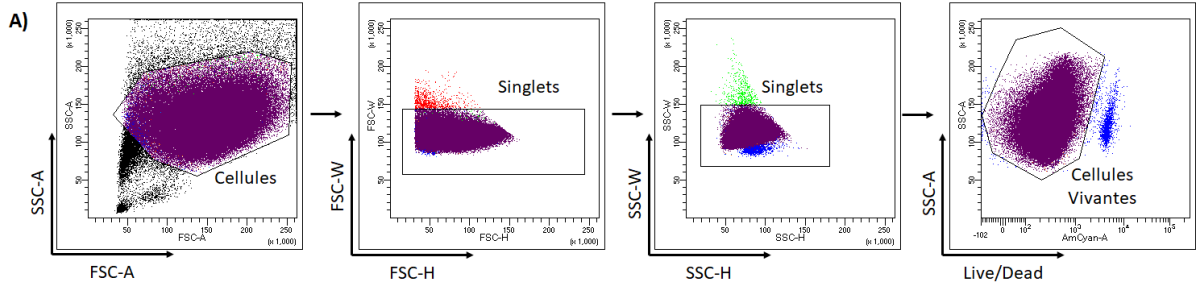


Figure 3. Les monocytes se différencient en cellules dendritiques immatures au jour 5 et acquièrent un phénotype mature après la stimulation par LPS au jour 7.

Les monocytes ont été mis en cultures avec GM-CSF et IL-4. Les cellules dendritiques immatures (iDC) ont été recueillies au jour 5. Les cellules restantes ont été traitées avec du LPS. Les cellules dendritiques matures (mDC) ont été recueillies au jour 7. Les cellules recueillies ont été marquées et analysées par cytométrie de flux. A) Stratégie de sélection des cellules. B) Les cellules ont été marquées pour CD14 et HLA-DR. L'absence d'expression de CD14 indique un changement de phénotype par rapport aux monocytes CD14+. De plus, HLA-DR est exprimé par les iDC et les mDC, suggérant une capacité de présentation d'antigènes. Ces résultats suggèrent que les cellules obtenues sont des cellules dendritiques (DC). C) Les cellules ont été marquées pour CD80, CD83 et CD86. CD80 et CD86 sont des molécules de co-stimulation et CD83 est un marqueur de maturation. Suite à l'exposition au LPS, l'expression de CD80, CD83 et CD86 augmentent tous, suggérant que les DC sont devenues matures.

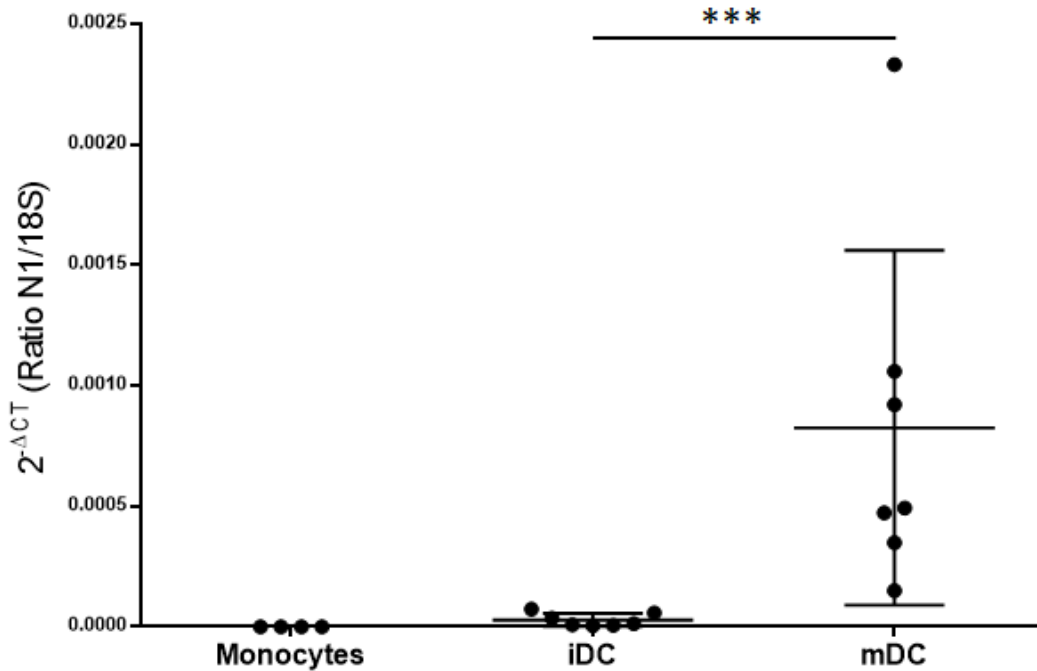


Figure 4. Les cellules dendritiques augmentent de façon significative leur expression d'ARN pour Nétrine-1 lors de la maturation.

Des monocytes, cellules dendritiques immatures (iDC) et matures (mDC) sont analysées par qPCR. L'expression d'ARN de Nétrine-1 est mesurée et comparée à celle du gène de contrôle, 18S. L'analyse statistique compare seulement les iDC aux mDC puisque les échantillons de monocytes sont non appariés. La valeur moyenne obtenue est de 0 pour les monocytes, 0,0000288 pour les iDC et de 0,0008258 pour les mDC. L'expression des mDC est augmentée de façon statistiquement significative par rapport aux iDC, avec une valeur p de 0,0002. N=4 donneurs pour les monocytes, N=7 donneurs pour les iDC et mDC. Test de Student apparié par ratio. $p \leq 0,001$ ***

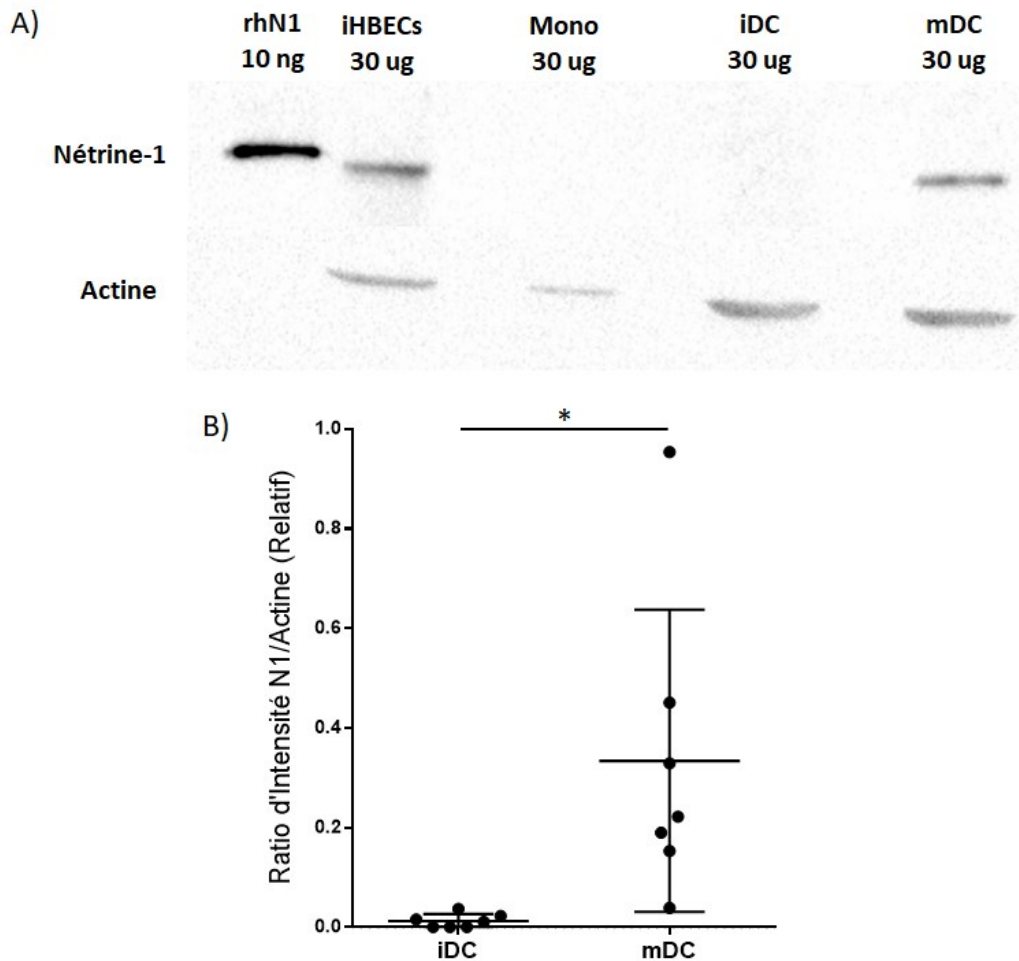


Figure 5. Les cellules dendritiques augmentent de façon significative leur expression de la protéine Nétrine-1 lors de leur maturation.

Des monocytes (Mono) et cellules dendritiques immatures (iDC) et matures (mDC) sont analysés par immunobuvardage. L'expression de la protéine Nétrine-1 est mesurée et comparée à celle de la protéine de contrôle, l'actine. A) Les images ont été obtenues avec un ChemiDoc et une période d'exposition de 10 minutes pour Nétrine-1 et 10 secondes pour l'actine. De la protéine Nétrine-1 recombinante humaine (rhN1) et des cellules endothéliales cérébrales humaines inflammées (iHBECs) sont utilisées comme contrôles positifs. Les échantillons utilisés dans cette image proviennent du même donneur et ont été utilisés en même temps que ceux de la figure 9. B) Graphique comparant l'expression de la protéine Nétrine-1 entre les iDC et les mDC. L'intensité relative de la bande Nétrine-1 divisée par celle de l'actine est utilisée comme mesure.

Les valeurs moyennes obtenues sont de 0,0141402 pour les iDC et de 0,3141751 pour les mDC. Il s'agit d'une valeur statistiquement significative, avec une valeur p de 0,0278. N=7 donneurs. Test de Student apparié. $p \leq 0,05$, *.

4.2 Les macrophages M1 expriment Nétrine-1 mais pas les M2

Nous avons démontré que les DC augmentent leur expression de N1 avec la maturation. Ces résultats soulèvent la possibilité que N1 soit exprimée par d'autres APC, notamment les macrophages. Certaines études ont déjà observé ce phénomène. Chez la souris, il a été démontré que le palmitate induit la production de N1 par les macrophages *in vitro* [281]. Chez l'humain, des macrophages exprimant N1 ont été observés par immunohistochimie dans des lésions de SEP [250]. Toutefois, ces études ne nous indiquent pas le phénotype des macrophages exprimant N1. Il est possible de classer grossièrement les macrophages en deux principales catégories : les macrophages M1, qui sont pro-inflammatoires, et les macrophages M2, qui sont plutôt anti-inflammatoires. Nous savons que des stimuli pro-inflammatoires stimulent la maturation des DC. Nous avons également démontré que les DC augmentent leur expression de N1 avec la maturation. Il est donc possible que la production de N1 par les APC est associée à l'inflammation. Si tel est le cas, nous nous attendons à observer les macrophages M1 exprimer N1 mais pas les macrophages M2.

Pour générer des macrophages *in vitro* et les différencier vers les phénotypes M1 ou M2, nous avons adapté un protocole déjà publié [296]. Des monocytes obtenus à partir du sang de donneurs sains ont été extraits et mis en culture pendant 5 jours avec 25 ng/mL de M-CSF. Ensuite, 20 ng/mL d'interféron- γ et 100 ng/mL de LPS ont été ajoutés pour la différenciation M1, tandis que 20 ng/mL d'IL-4 et 20 ng/mL d'IL-13 ont été ajoutés pour la différenciation M2. Les macrophages différenciés ont été recueillis au jour 7. **(Fig.6)**

Nous avons validé le processus de différenciation des macrophages en utilisant la cytométrie de flux. Nous avons mis l'accent sur deux marqueurs principaux : CD80, qui est un marqueur pour les macrophages M1 [297], et CD209, qui est un marqueur pour les macrophages M2 [298]. Nous avons noté chez les macrophages M1 une nette prédominance de CD80 avec une absence de CD209. Les macrophages M2, eux, démontraient une expression très élevée de CD209 avec une expression diminuée de CD80. **(Fig.7)**

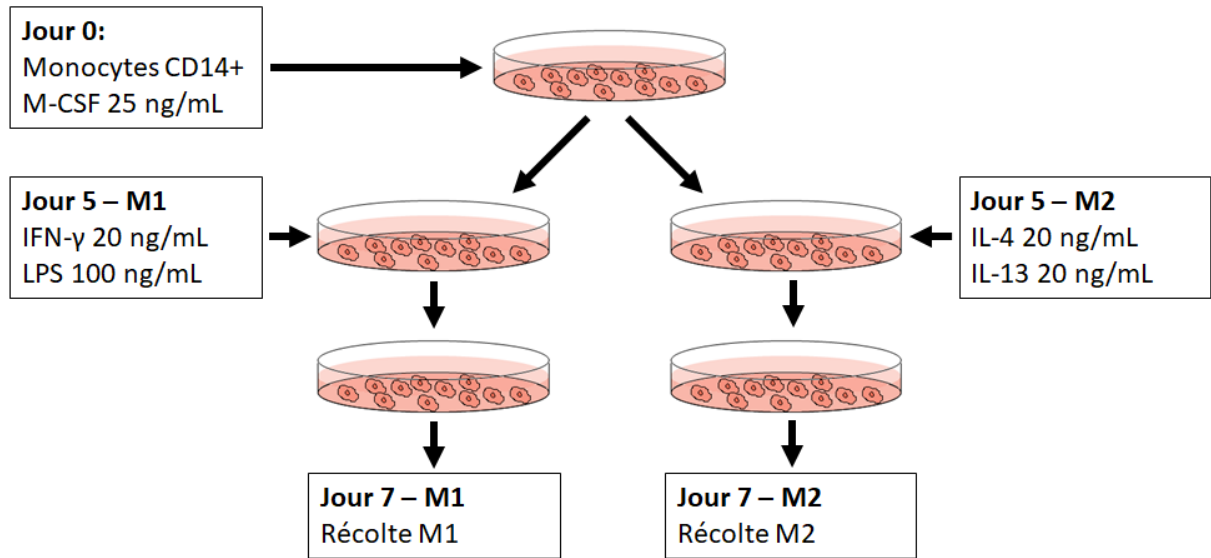


Figure 6. Protocole de différenciation des macrophages M1 et M2.

Les cellules mononucléées périphériques sanguines sont extraites par Ficoll et les monocytes CD14+ sont extraits avec des billes magnétiques à sélection positive. Les cellules sont mises en culture à une concentration de 1 million par mL, 2 mL par puit. On y ajoute 25 ng/mL de M-CSF. Au jour 5, les macrophages peuvent être différenciés en macrophages M1 ou en macrophages M2. Pour la différenciation M1, on ajoute 20 ng/mL d'interféron- γ et 100 ng/mL de LPS. Pour la différenciation M2, on ajoute 20 ng/mL d'IL-4 et 20 ng/mL d'IL-13. Dans les deux cas, les macrophages différenciés sont recueillis au jour 7. Les cellules recueillies sont mises en culot et conservées à -80°C

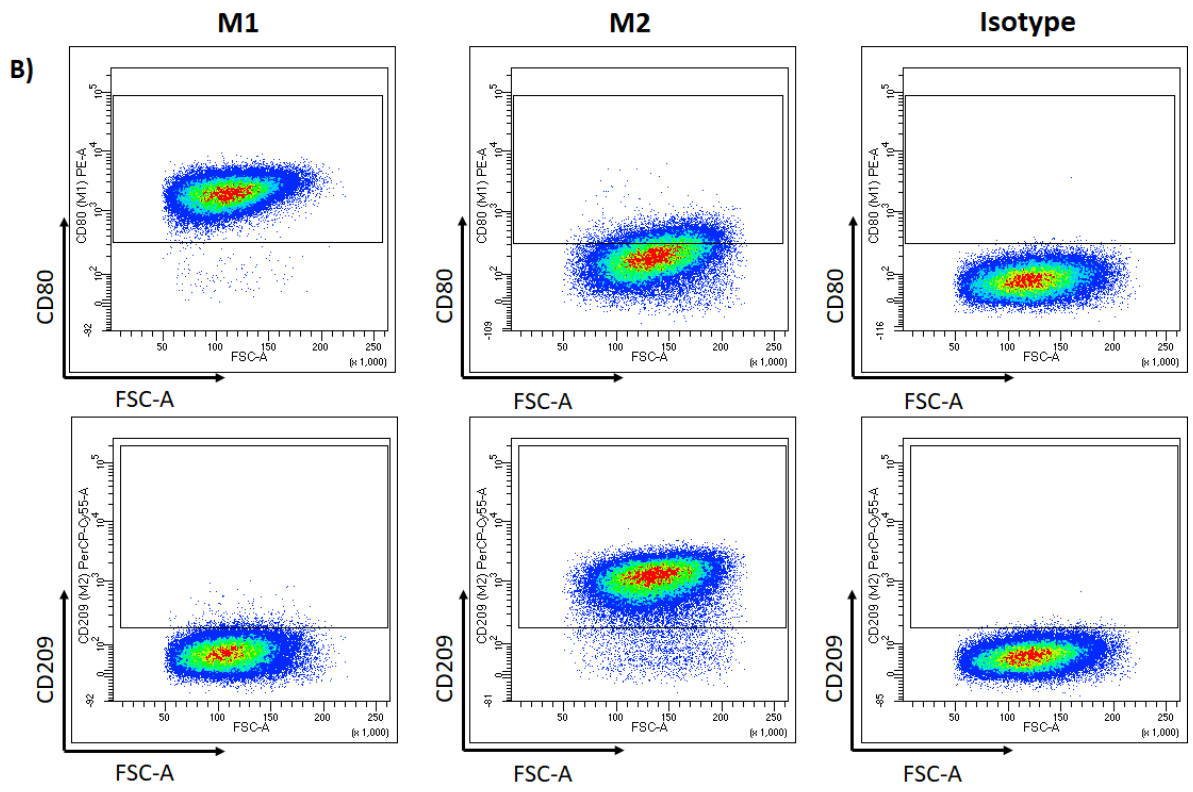
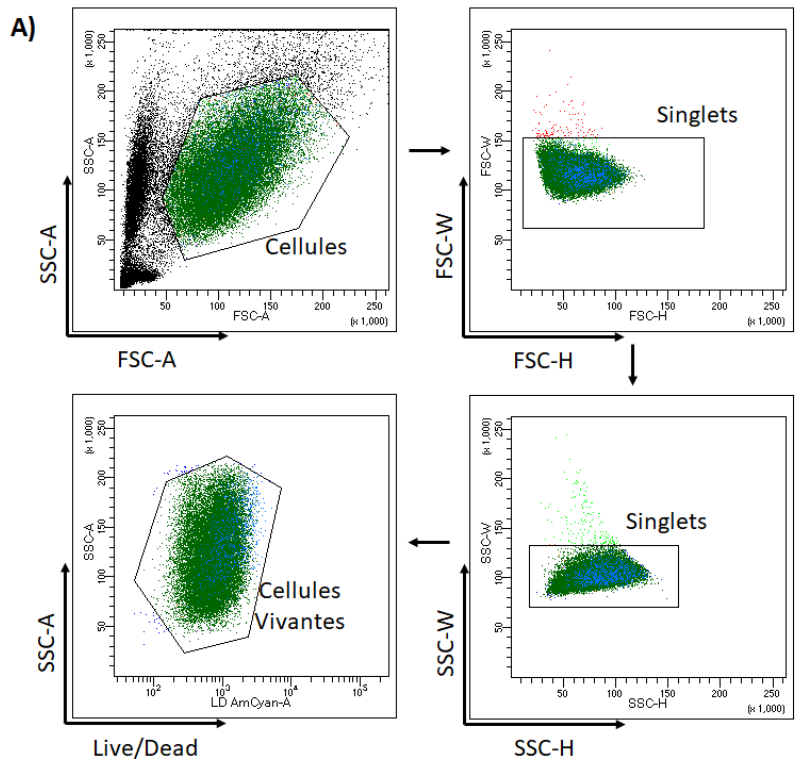


Figure 7. Les macrophages générés expriment un phénotype M1 ou M2 suite à la différenciation.

Les monocytes ont été mis en culture avec du M-CSF pour les différencier en macrophages. Au jour 5, de l'interféron- γ et du LPS ont été ajoutés pour faire la différenciation M1 alors que IL-4 et IL-13 ont été ajoutés pour faire la différenciation M2. Les cellules ont été recueillies au jour 7. Les cellules ont été marquées pour CD80 (marqueur M1) et CD209 (marqueur M2), puis analysées par cytométrie de flux. A) Stratégie de sélection des cellules. B) Les macrophages cultivés avec interféron- γ et LPS démontrent une expression totale de CD80 et une absence de CD209. Les macrophages cultivés avec IL-4 et IL-13 ont une faible expression de CD80 avec une expression totale de CD209. Ces résultats démontrent que les macrophages M1 et M2 ainsi cultivés obtiennent le phénotype attendu.

Pour caractériser l'expression de N1 par les macrophages, nous avons d'abord quantifié l'expression d'ARN de N1 par qPCR. **(Fig.8)** L'ARN fut extrait des échantillons de macrophages M1 et M2. Le gène 18S fut utilisé comme gène de contrôle, et l'expression relative de N1 par rapport à 18S fut calculée. Les macrophages M1 démontrent une expression nette, avec une valeur de 0,0000758. Les macrophages M2, quant à eux, ne parvenaient jamais à atteindre le seuil de détection, résultant en une valeur moyenne de 0. L'expression de l'ARN de N1 semble donc spécifique aux macrophages M1.

À l'instar des DC, il est nécessaire de démontrer l'expression de la protéine N1 par les macrophages pour valider les résultats obtenus au qPCR. **(Fig.9)** En utilisant la technique d'immunobuvardage, nous avons mesuré l'expression de la protéine N1. Nous avons utilisé l'actine comme contrôle pour s'assurer que la masse de protéine de chacun des échantillons était équivalente. Conformément à ce qui a été démontré par qPCR, nous observons systématiquement une bande nette pour les macrophages M1. Les macrophages M2, eux, n'expriment jamais la moindre bande. Les résultats obtenus au qPCR et à l'immunobuvardage suggèrent que N1 est exprimé par les macrophages de phénotype M1 mais pas par ceux de phénotype M2.

4.3 Nétrine-1 augmente la prolifération des lymphocytes T CD4+

Les mDC et les macrophages M1 ont la capacité de présenter des antigènes aux lymphocytes T et d'influencer leur fonction. Nos données suggèrent que ces APC expriment N1. Il est possible que la N1 produite par les APC influence les lymphocytes T lors de la présentation d'antigènes. Une des principales conséquences de l'activation des lymphocytes T par les DC est l'induction de la prolifération cellulaire et il est possible que N1 ait une influence sur cette fonction. De plus, cette influence peut différer entre les différents sous-types de lymphocytes, tels les sous-types pro-inflammatoires TH1 ou TH17 qui sont particulièrement impliqués dans la pathogénèse de la SEP. L'influence de N1 sur la prolifération des lymphocytes TH1 et TH17 constitue donc une question d'intérêt.

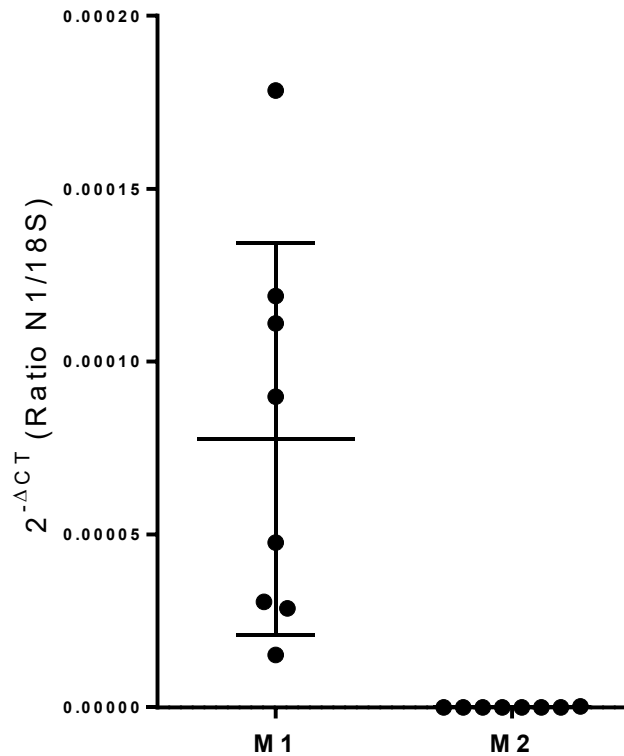


Figure 8. Les macrophages M1 expriment l'ARN pour Nértrine-1, mais pas les macrophages M2.

Des macrophages M1 (M1) ou M2 (M2) sont analysés par qPCR. L'expression d'ARN de Nértrine-1 est mesurée et comparée à celle du gène de contrôle, 18S. La valeur moyenne obtenue est de 0,0000758 pour les macrophages M1 et 0 pour les macrophages M2. On observe donc une expression d'ARN Nértrine-1 pour les macrophages M1, mais pas pour les macrophages M2. N=8 donneurs.

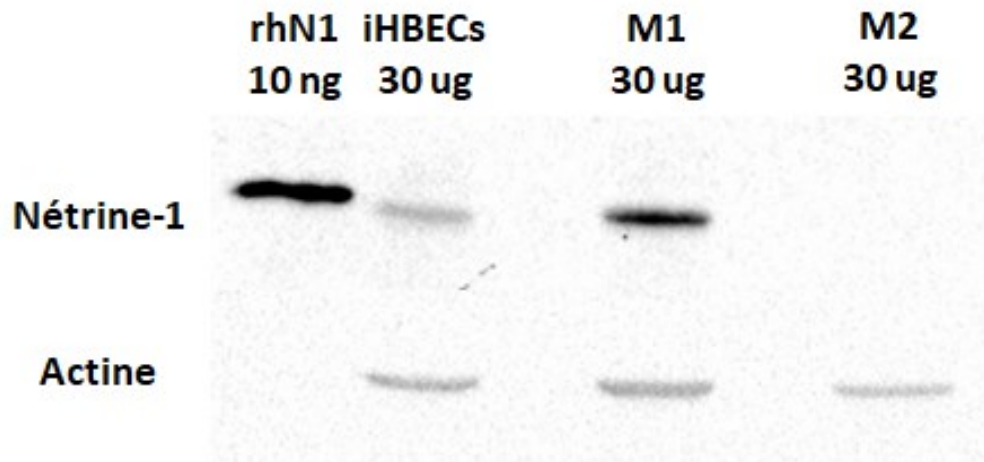


Figure 9. Les macrophages M1 expriment la protéine Nétrine-1, mais pas les macrophages M2.

Des macrophages M1 et M2 sont analysés par immunobuvardage. L'expression de la protéine Nétrine-1 est mesurée et comparée à celle de la protéine de contrôle, l'actine. A) Les images ont été obtenues avec un ChemiDoc et une période d'exposition de 10 minutes pour Nétrine-1 et 10 secondes pour l'actine. De la protéine Nétrine-1 recombinante humaine (rhN1) et des cellules endothéliales cérébrales humaines inflammées (iHBECs) sont utilisées comme contrôles positifs. Les échantillons utilisés dans cette image proviennent du même donneur et ont été utilisés en même temps que ceux de la figure 5. Les macrophages M1 exhibent toujours une bande de Nétrine-1 de forte intensité. Les macrophages M2, quant-à-eux, n'expriment jamais de bande. N=7 donneurs.

Pour mesurer l'impact de N1 sur la prolifération des lymphocytes T CD4+, nous avons extrait les lymphocytes T CD4+ totaux à partir du sang de donneurs sains. Nous avons marqué les cellules avec le CFSE, marqueur qui permet d'évaluer la prolifération cellulaire. Lors de la mitose, les molécules de CFSE sont distribuées entre les deux cellules résultantes. Il est donc possible d'estimer le nombre de cycles mitotiques qu'une cellule a subis en mesurant l'intensité du marquage CFSE. Les cellules, une fois marquées, ont été mises en culture avec un anticorps anti-CD3 OKT-3 et un anticorps anti-CD28. **(Fig.10)** Ces anticorps ont pour effet de simuler la présentation d'un antigène par une APC et d'induire la prolifération des lymphocytes. De plus, on a ajouté des cytokines aux cellules pour induire la polarisation. Pour les TH1, on a ajouté de l'IL-12 avec un anticorps anti-IL-4. Pour les TH17, on a ajouté IL-23 avec des anticorps anti-IL-4 et anti-IFN- γ . La moitié des cellules fut également traitée avec 100 ng/mL de N1 et comparée aux cellules de contrôle. Il a été démontré empiriquement que les moments idéaux pour observer la prolifération sont les jours 4 et 5. **(Fig.11)** Nous avons donc recueilli les cellules à ces jours en particulier. Les cellules furent analysées par cytométrie de flux et le pourcentage de cellules en prolifération fut calculé. **(Fig.12)**

Pour les TH1, nous observons au jour 4 un pourcentage de cellules prolifératives de 44,51% pour le groupe contrôle et de 45,05% pour le groupe N1. Il ne s'agit pas d'une différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,7165. Toutefois, au jour 5, le pourcentage de cellules prolifératives est de 78,71% pour le groupe contrôle et de 82,68% pour le groupe N1. Il s'agit d'une augmentation statistiquement significative, avec une valeur p de 0,0022. **(Fig.13)** Pour les TH17, nous observons un comportement similaire. Au jour 4, le pourcentage de cellules prolifératives est de 40,31% pour le groupe contrôle et de 40,37% pour le groupe Nétrine-1, donnant une valeur p de 0,4817. Au jour 5, le pourcentage de cellules prolifératives est de 76,28% pour le groupe contrôle et de 78,35% pour le groupe N1. Il s'agit d'une augmentation statistiquement significative, avec une valeur p de 0,0023. **(Fig.14)** N1 augmente donc la prolifération des lymphocytes TH1 et TH17 au jour 5 mais pas au jour 4.

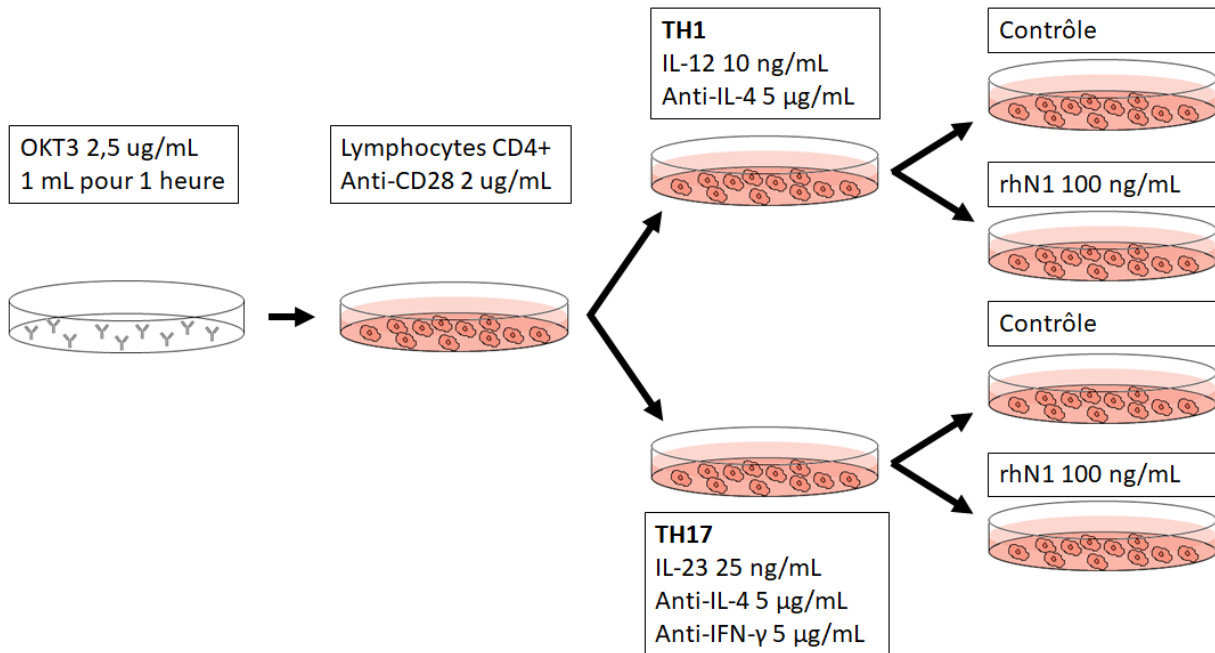


Figure 10. Protocole d'activation et de polarisation des lymphocytes T CD4+.

Une solution de PBS avec 2,5 µg/mL d'OKT-3 est préparée et 1 mL de cette solution est déposée dans des plaques à 6 puits, avec un volume de 1 mL par puit. Les plaques sont mises à incuber à 37°C pour au moins une heure. Cette étape permet aux anticorps de se fixer au fond du puit. Les lymphocytes T CD4+ extraits du sang de donneurs sains, marqués avec le CFSE ou non, sont suspendus dans le milieu de culture auquel est ajouté 2 µg/mL d'anticorps anti-CD28. Cette suspension est divisée en deux et les cocktails de polarisation y sont ajoutés. Pour la polarisation TH1, 10 ng/mL d'IL-12 et 5 µg/mL d'anticorps anti-IL-4 sont ajoutés. Pour la polarisation TH17, 25 ng/mL d'IL-23, 5 µg/mL d'anticorps anti-IL-4 et 5 µg/mL d'anticorps anti-interféron-γ sont ajoutés. Ces suspensions sont à nouveau séparées en deux. La protéine Nétrine-1 recombinante humaine (rhN1) est ajoutée à une des deux suspensions à une concentration de 100 ng/mL. Les suspensions restantes sont utilisées comme groupes de contrôle. La solution d'OKT-3 est retirée des puits et les suspensions cellulaires y sont ajoutées. Les plaques sont mises à incuber à 37°C et seront recueillies au jour approprié.

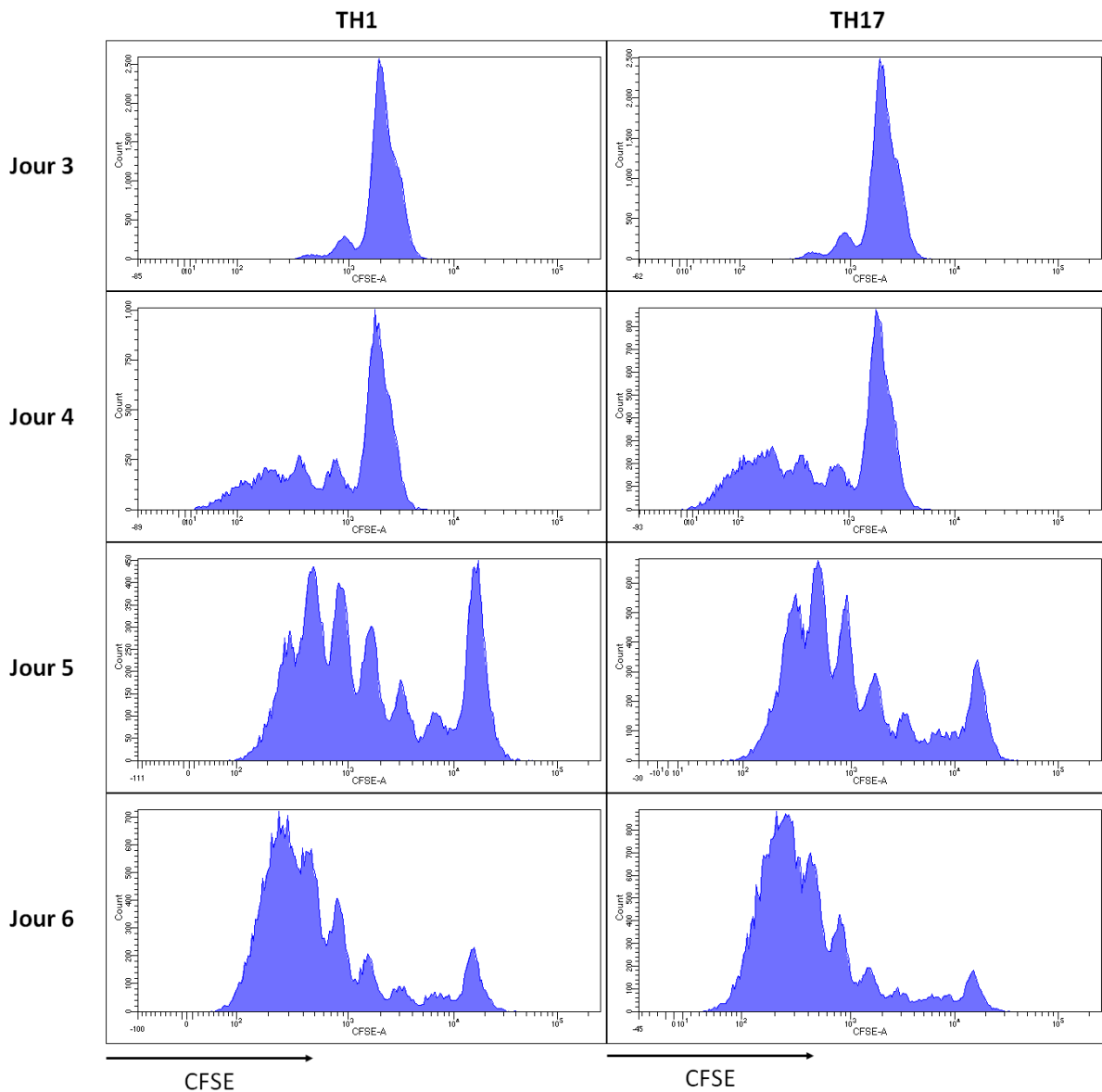


Figure 11. Le marquage CFSE est optimal aux jours 4 et 5 pour les lymphocytes T CD4.

Les lymphocytes CD4⁺ sont extraits de donneurs sains et sont marqués avec le CFSE. Les cellules marquées sont mises en culture et polarisées vers les sous-types TH1 ou TH17. Les cellules sont recueillies aux jours 3, 4, 5 et 6 et sont analysées par cytométrie de flux. Les paramètres du cytomètre ont été ajustés aux jours 5 et 6 afin de mieux visualiser le signal, expliquant le décalage du pic non prolifératif. Au jour 3,

on note que presque aucune cellule n'a proliféré. La prolifération cellulaire débute à peine à cette étape. Aux jours 4 et 5, on note plusieurs pics bien définis, suggérant que le nombre de cycles mitotiques complétés varie beaucoup entre les cellules. La prolifération cellulaire est débutée mais pas encore achevée. Au jour 6, on note une accumulation des cellules vers les pics les plus faibles ainsi qu'un nombre de cellules non prolifératives très bas. La grande majorité de la prolifération cellulaire est complétée à cette étape.

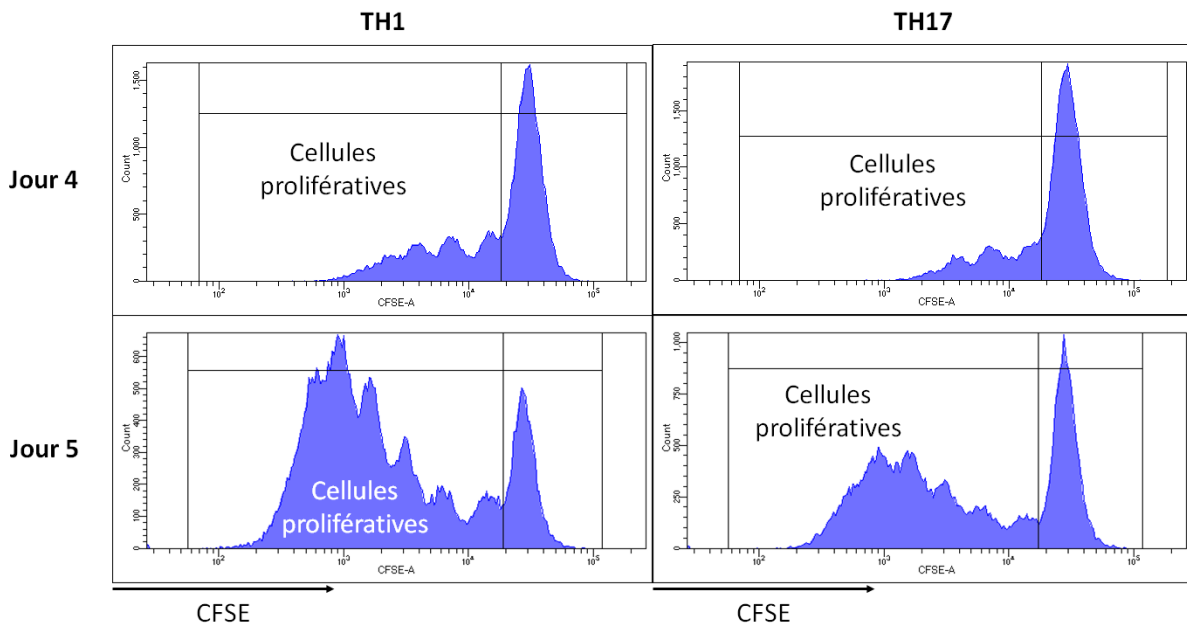


Figure 12. Stratégie de sélection des lymphocyte T CD4+ prolifératifs par marquage CFSE.

Les lymphocytes CD4+ sont extraits de donneurs sains et sont marqués avec le CFSE. Les cellules marquées sont mises en culture et polarisées vers les sous-types TH1 ou TH17. La moitié des cellules est traitée avec 100 ng/mL de Nétrine-1 recombinante à jour 0 et l'autre moitié sert de contrôle. Les cellules sont recueillies aux jours 4 et 5 et sont analysées par cytométrie de flux. Le pic le plus à droite représente les cellules portant la plus grande quantité du marqueur CFSE. Il s'agit des cellules qui n'ont pas proliféré et elles sont sélectionnées à part. Tous les autres pics sont sélectionnés ensemble et représentent les cellules prolifératives. Le pourcentage de cellules prolifératives est déterminé à partir de cette sélection.

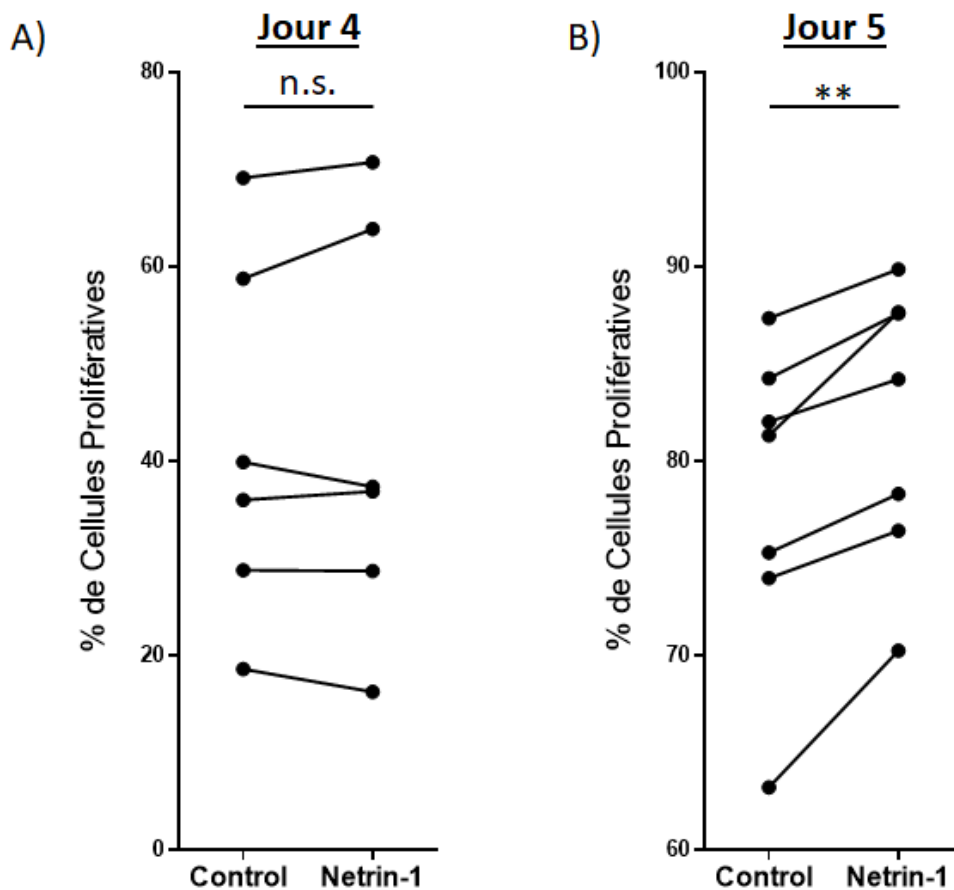


Figure 13. Nétrine-1 augmente la prolifération des lymphocytes TH1 à jour 5.

Des lymphocytes T CD4+ sont marqués avec CFSE et polarisés en TH1. Un groupe contrôle est comparé à un groupe traité avec 100 ng/mL de Nétrine-1 recombinante à jour 0. Les lymphocytes TH1 sont recueillis aux jours 4 et 5 et analysés par cytométrie de flux. Le marquage CFSE est utilisé pour déterminer le pourcentage de cellules prolifératives par rapport au nombre total de cellules. A) Au jour 4, le pourcentage de cellules prolifératives est de 44,51% pour le groupe contrôle et de 45,05% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,7165. B) Au jour 5, le pourcentage de cellules prolifératives est de 78,71% pour le groupe contrôle et de 82,68% pour le groupe Nétrine-1. Il s'agit d'une augmentation statistiquement significative, avec une valeur p de 0,0022. N=6 pour jour 4, N=7 pour jour 5. Résultats en triplicats. Test de Student apparié. $p \leq 0,01$ **.

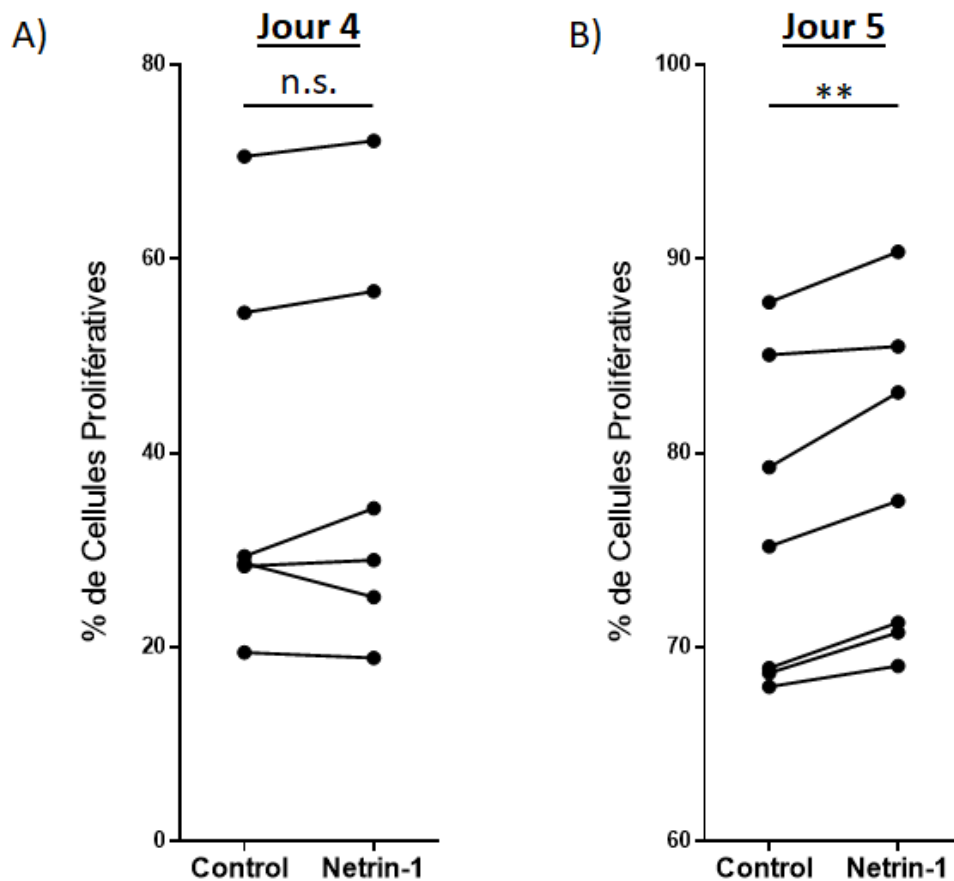


Figure 14. Nétrine-1 augmente la prolifération des lymphocytes TH17 à jour 5.

Des lymphocytes T CD4+ sont marqués avec CFSE et polarisés en TH17. Un groupe contrôle est comparé à un groupe traité avec 100 ng/mL de Nétrine-1 à jour 0. Les lymphocytes TH17 sont recueillis aux jours 4 et 5 et analysés par cytométrie de flux. Le marquage CFSE est utilisé pour déterminer le pourcentage de cellules prolifératives par rapport au nombre total de cellules. A) Au jour 4, le pourcentage de cellules prolifératives est de 40,31% pour le groupe contrôle et de 40,37% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,4817. B) Au jour 5, le pourcentage de cellules prolifératives est de 76,28% pour le groupe contrôle et de 78,35% pour le groupe Nétrine-1. Il s'agit d'une augmentation statistiquement significative, avec une valeur p de 0,0023. N=6 pour jour 4, N=7 pour jour 5. Résultats en triplicats. Test de Student apparié. $p \leq 0,01$ **.

4.4 Nétrine-1 diminue sélectivement l'expression de cytokines par les lymphocytes TH17

Une autre fonction importante des APC dans l'activation des lymphocytes T est la production de cytokines qui influencent la polarisation lymphocytaire. Les lymphocytes polarisés d'une façon auront un profil d'expression de cytokines différent des lymphocytes polarisés autrement. Il est possible que la N1 produite par les APC altère la production de cytokines des lymphocytes T CD4+ lors de la présentation d'antigène. Chez la souris, il a été démontré que N1 diminue significativement l'expression de plusieurs types de cytokines par les lymphocytes T CD4+ activés, incluant IFN- γ et IL-17 [277]. Il n'existe toutefois pas d'études portant sur le même phénomène chez l'humain. L'influence de la polarisation lymphocytaire sur cette réponse cellulaire n'est également pas décrite. À l'instar de ce que nous avons fait pour la prolifération, nous mesurons l'impact de N1 sur la production de cytokines des lymphocytes TH1 et TH17.

Pour évaluer l'impact de N1 sur l'expression de cytokines des lymphocytes T CD4+, nous avons extrait les lymphocytes T CD4+ totaux du sang de donneurs sains. Les cellules furent mises en culture avec l'OKT-3, l'anticorps anti-CD28 et les cocktails de polarisation. **(Fig.10)** La moitié des cellules furent traitées avec 100 ng/mL de N1, l'autre moitié fut utilisée comme groupe de contrôle. Les cellules furent recueillies au jour 6, stimulées puis marquées pour l'expression des cytokines IFN- γ , TNF- α et IL-17. Les cellules furent enfin analysées par cytométrie de flux et le pourcentage de cellules exprimant les diverses cytokines d'intérêt fut mesuré. **(Fig.15)**

D'une part, nous n'observons pas de différences significatives chez les lymphocytes TH1. **(Fig.16)** Le pourcentage de cellules exprimant interféron- γ est de 58,62% pour le groupe contrôle et de 58,68% pour le groupe N1, avec une valeur p de 0,7261. Le pourcentage de cellules exprimant TNF- α est de 85,47% pour le groupe contrôle et de 84,89% pour le groupe N1, avec une valeur p de 0,2231. Le pourcentage de cellules exprimant IL-17 est de 0,68% pour le groupe contrôle et de 0,71% pour le groupe N1, avec une valeur p de 0,3639. D'autre part, N1 induit une diminution de l'expression d'interféron- γ et d'IL-17 par les lymphocytes TH17. **(Fig.17)** Le

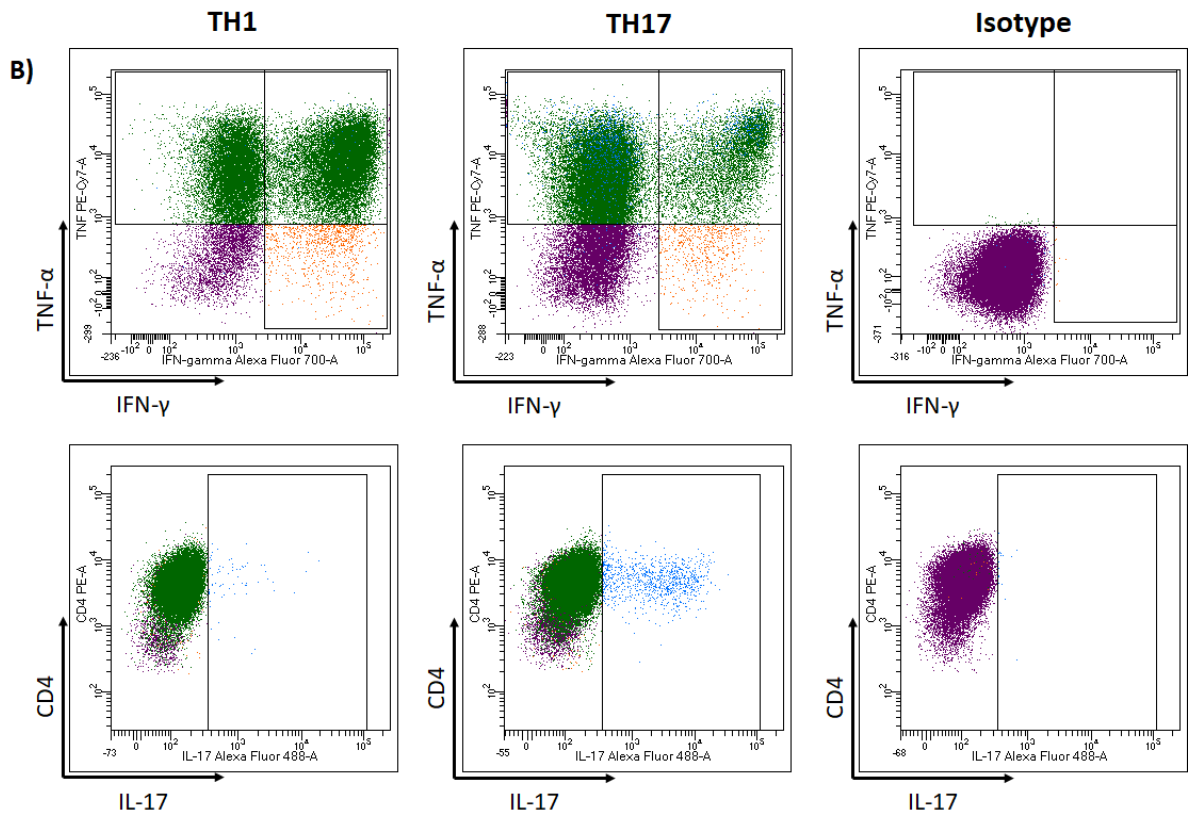
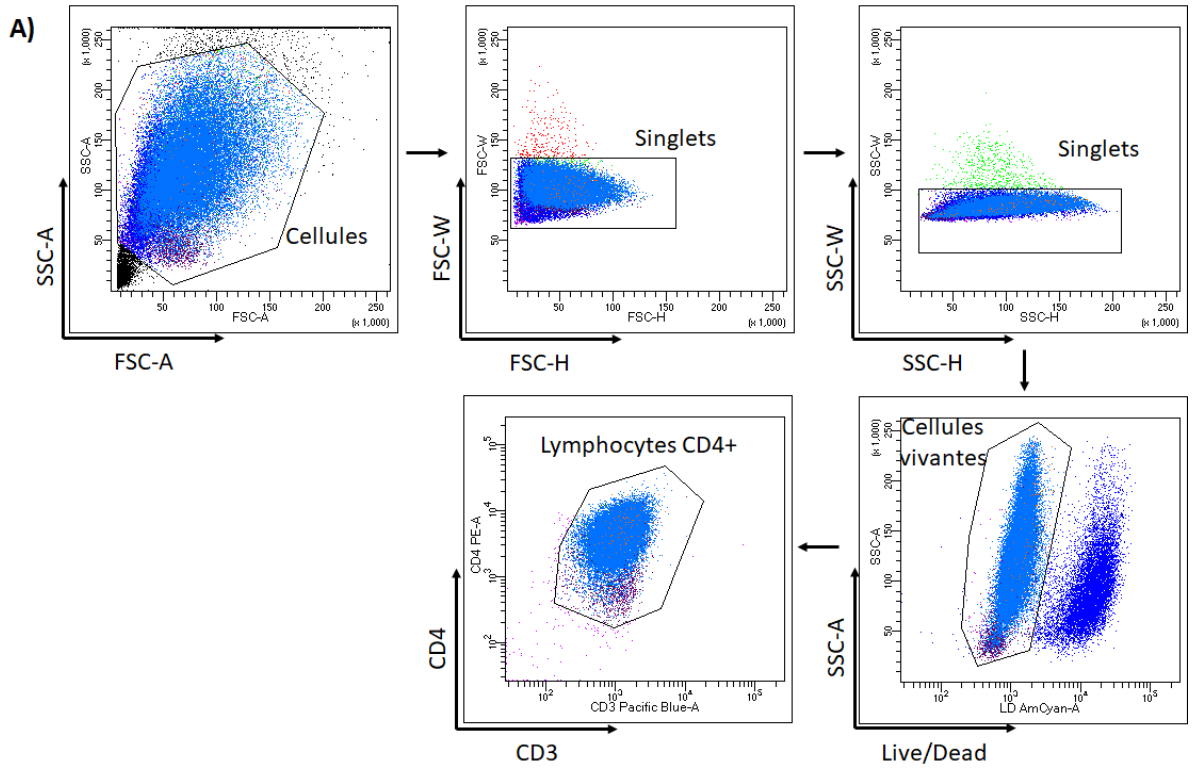


Figure 15. Stratégie de sélection des lymphocytes T CD4+ pour la mesure de l'expression des cytokines.

Les lymphocytes CD4+ sont extraits de donneurs sains et sont mis en culture et polarisés vers les sous-types TH1 ou TH17. La moitié des cellules est traitée avec 100 ng/mL de Nétrine-1 recombinante à jour 0 et l'autre moitié sert de contrôle. Les cellules sont recueillies au jour 6 et sont marquées pour IFN- γ , TNF- α et IL-17. Les cellules sont analysées par cytométrie de flux. A) Stratégie de sélection des cellules. B) Pour la mesure des cytokines, les cellules sont sélectionnées en fonction d'un isotype et de la morphologie des populations. Le pourcentage de cellules exprimant chaque cytokine est déterminé pour chaque échantillon.

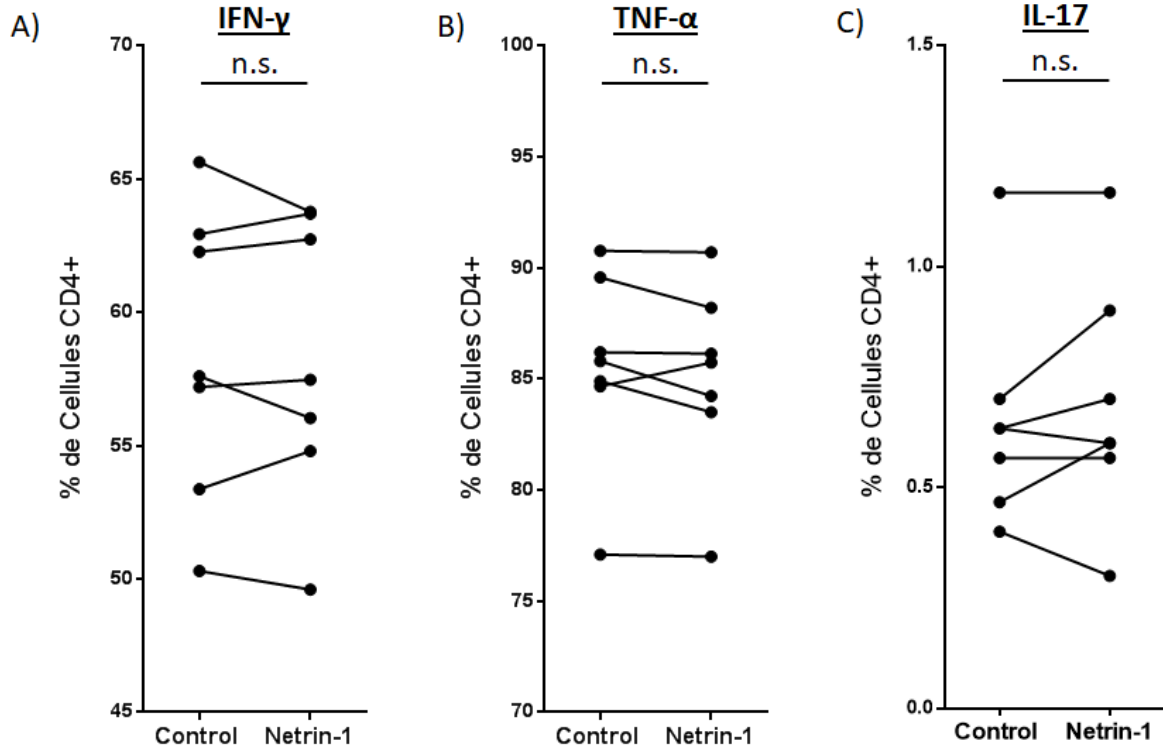


Figure 16. Nétrine-1 n'influence pas la production de cytokines par les lymphocytes TH1.

Des lymphocytes T CD4+ sont polarisés en TH1. Un groupe contrôle est comparé à un groupe traité avec 100 ng/mL de Nétrine-1 à jour 0. Les lymphocytes TH1 sont recueillis au jour 6, marqués avec des anticorps et analysés par cytométrie de flux. A) Le pourcentage de cellules exprimant interféron- γ est de 58,62% pour le groupe contrôle et de 58,68% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,7261. B) Le pourcentage de cellules exprimant TNF- α est de 85,47% pour le groupe contrôle et de 84,89% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,2231. C) Le pourcentage de cellules exprimant IL-17 est de 0,68% pour le groupe contrôle et de 0,71% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,3639. N=7 donneurs. Résultats en triplicats. Test de Student apparié. $p \leq 0,05$ *.

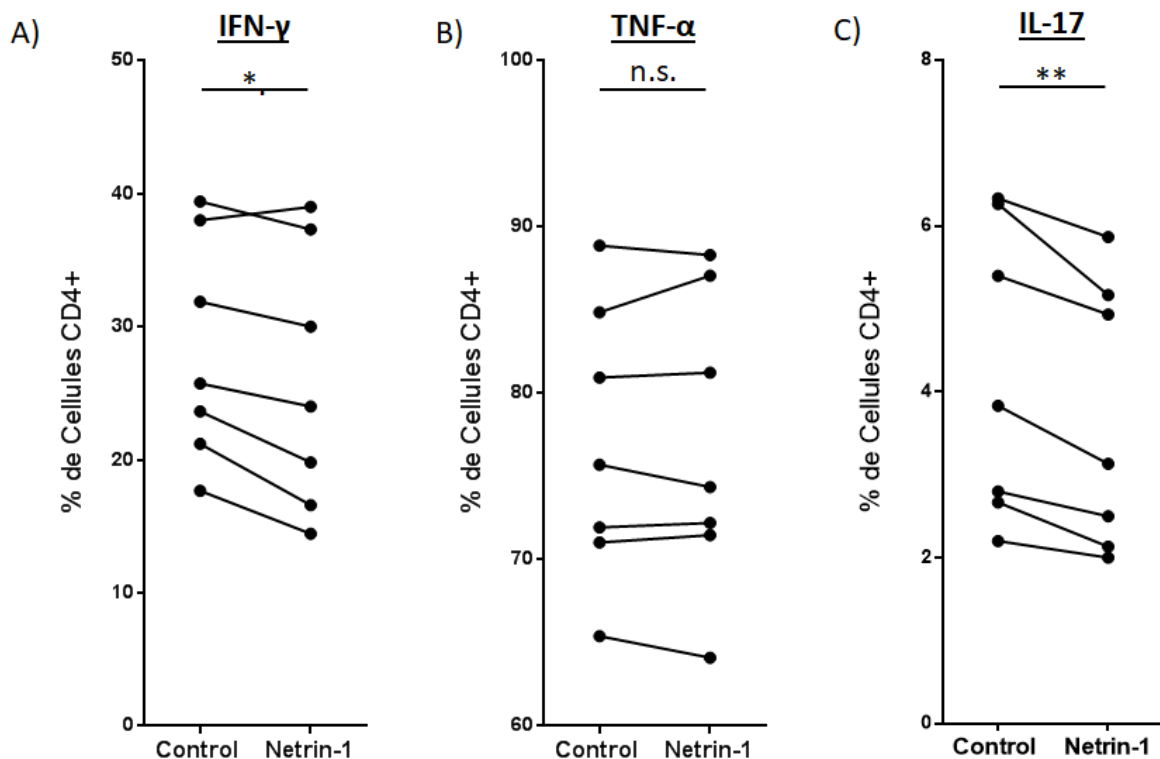


Figure 17. Nétrine-1 diminue la production d'interféron- γ et d'IL-17 par les lymphocytes TH17.

Des lymphocytes T CD4+ sont polarisés en TH17. Un groupe contrôle est comparé à un groupe traité avec 100 ng/mL de Nétrine-1 à jour 0. Les lymphocytes TH17 sont recueillis au jour 6, marqués avec des anticorps et analysés par cytométrie de flux. A) Le pourcentage de cellules exprimant interféron- γ est de 29,97% pour le groupe contrôle et de 27,78% pour le groupe Nétrine-1. On observe une diminution statistiquement significative, avec une valeur p de 0,0146. B) Le pourcentage de cellules exprimant TNF- α est de 77,96% pour le groupe contrôle et de 77,88% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,9999. C) Le pourcentage de cellules exprimant IL-17 est de 4,47% pour le groupe contrôle et de 3,93% pour le groupe Nétrine-1. On observe une diminution statistiquement significative, avec une valeur p de 0,0029. N=7 donneurs. Résultats en triplicats. Test de Student apparié. $p \leq 0,05$ *, $p \leq 0,01$ **.

pourcentage de cellules exprimant IFN- γ est de 29,97% pour le groupe contrôle et de 27,78% pour le groupe N1, ce qui constitue une diminution statistiquement significative avec une valeur p de 0,0146. Le pourcentage de cellules exprimant TNF- α est de 77,96% pour le groupe contrôle et de 77,88% pour le groupe Nétrine-1, avec une valeur p de 0,9999. Le pourcentage de cellules exprimant IL-17 est de 4,47% pour le groupe contrôle et de 3,93% pour le groupe Nétrine-1, ce qui constitue une diminution statistiquement significative avec une valeur p de 0,0029. Ces résultats suggèrent un effet sélectif de N1 sur la production de cytokines par les lymphocytes T CD4+ activés et polarisés, n'influençant pas les lymphocytes TH1 mais diminuant la production d'IFN- γ et d'IL-17 par les lymphocytes TH17.

4.5 Nétrine-1 n'influence pas l'expression de molécules d'adhérence par les lymphocytes T CD4+

Un aspect non négligeable de la réponse lymphocytaire est l'expression de CAM. Ces dernières peuvent faciliter leur interaction avec les APC, leur rétention dans les tissus ou leur migration à travers la BHE. Il a été démontré que MCAM facilite la migration de lymphocytes TH17 à travers la BHE [207]. Les molécules ALCAM et VLA-4 sont également exprimées par les lymphocytes et facilitent leur migration à travers la BHE [206, 209]. De plus, plusieurs études murines suggèrent que PECAM pourrait avoir un rôle protecteur dans l'inflammation médiée par les lymphocytes T [299]. Ainsi, la production de N1 par les APC pourrait affecter l'expression de molécules d'adhérence par les lymphocytes T, affectant leur capacité à infiltrer le SNC.

Pour évaluer l'impact de N1 sur l'expression de CAM des lymphocytes T CD4+, nous avons extrait les lymphocytes T CD4+ totaux du sang de donneurs sains. Les cellules furent mises en culture avec l'OKT-3, l'anticorps anti-CD28 et les cocktails de polarisation. **(Fig.10)** La moitié des cellules furent traitées avec 100 ng/mL de N1, l'autre moitié fut utilisée comme groupe de contrôle. Les cellules furent recueillies au jour 6 puis marquées pour l'expression des molécules d'adhérence MCAM, ALCAM, VLA-4 et PECAM. Les cellules furent enfin analysées par cytométrie de flux et le pourcentage de cellules exprimant les diverses molécules d'intérêt fut mesuré. **(Fig.18)**

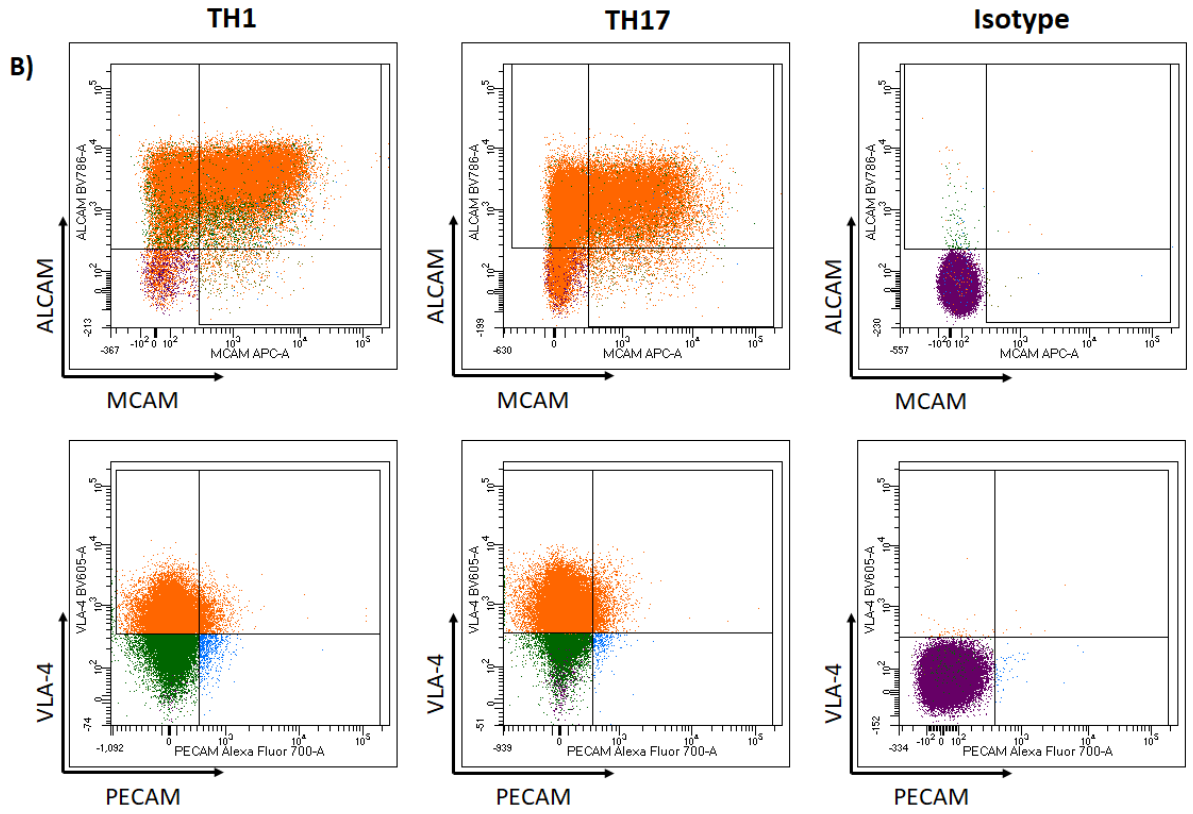
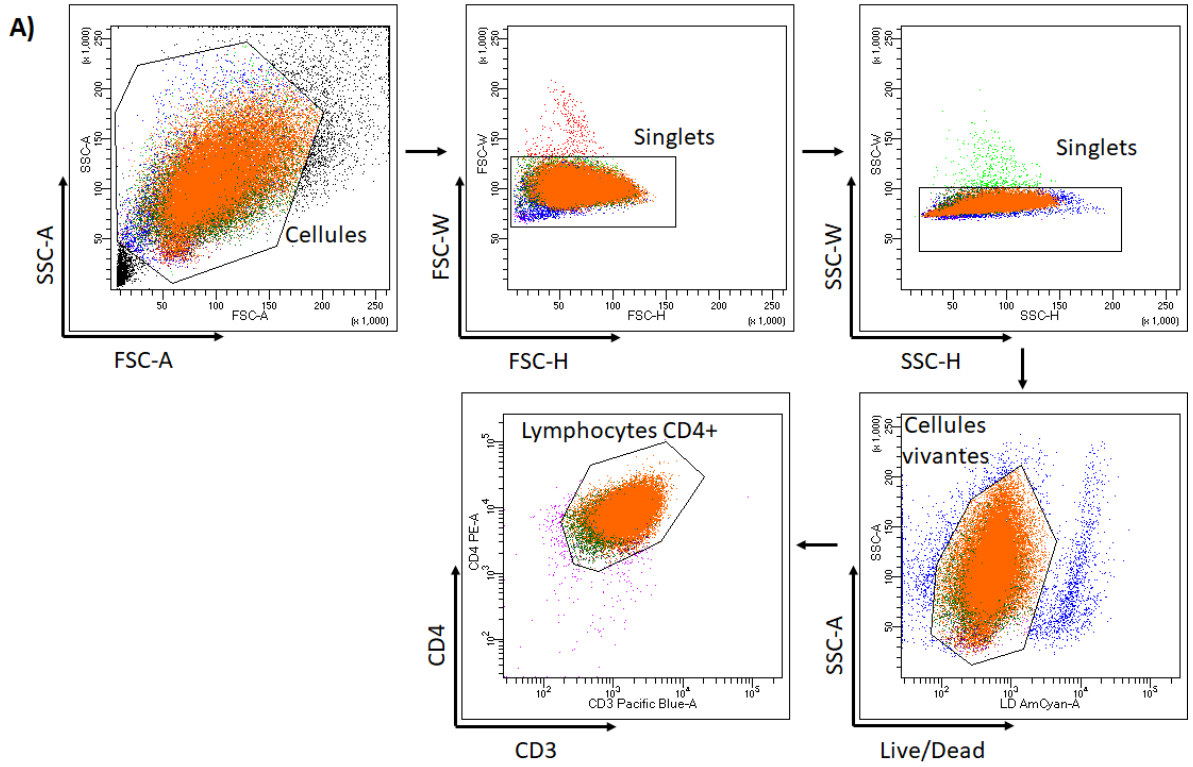


Figure 18. Stratégie de sélection des lymphocytes T CD4+ pour la mesure de l'expression des molécules d'adhérence.

Les lymphocytes CD4+ sont extraits de donneurs sains et sont mis en culture et polarisés vers les sous-types TH1 ou TH17. La moitié des cellules est traitée avec 100 ng/mL de Nétrine-1 recombinante à jour 0 et l'autre moitié sert de contrôle. Les cellules sont recueillies au jour 6 et sont marquées pour MCAM, ALCAM, PECAM et VLA-4. Les cellules sont analysées par cytométrie de flux. A) Stratégie de sélection des cellules. B) Pour la mesure des molécules d'adhérence, les cellules sont sélectionnées en fonction d'un isotype. Le pourcentage de cellules exprimant chaque molécule d'adhérence est déterminé pour chaque échantillon.

Pour les lymphocytes TH1, nous n'avons pas observé de différences statistiquement significatives avec le traitement de N1. **(Fig.19)** Le pourcentage de cellules exprimant MCAM est de 62,94% pour le groupe contrôle et de 63,01% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,5706. Le pourcentage de cellules exprimant ALCAM est de 90,34% pour le groupe contrôle et de 90,92% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,3200. Le pourcentage de cellules exprimant PECAM est de 4,43% pour le groupe contrôle et de 4,31% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,9574. Le pourcentage de cellules exprimant VLA-4 est de 61,78% pour le groupe contrôle et de 62,62% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,2118. Pour les lymphocytes TH17, nous n'avons pas observé de différences statistiquement significatives avec le traitement de N1 non plus. **(Fig.20)** Le pourcentage de cellules exprimant MCAM est de 39,75% pour le groupe contrôle et de 39,56% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,9339. Le pourcentage de cellules exprimant ALCAM est de 80,18% pour le groupe contrôle et de 81,02% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,3691. Le pourcentage de cellules exprimant PECAM est de 2,71% pour le groupe contrôle et de 2,72% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,6487. Le pourcentage de cellules exprimant VLA-4 est de 75,02% pour le groupe contrôle et de 77,20% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,0588. Ces résultats suggèrent que N1 n'a pas d'influence sur l'expression des molécules d'adhérence par les lymphocytes TH1 ou TH17.

4.6 Nétrine-1 augmente la prolifération des lymphocytes T CD8+

Les lymphocytes T CD8+ sont considérablement impliqués dans la pathogénèse de la SEP. En effet, ils sont particulièrement abondants dans l'espace périvasculaire dans les lésions de SEP [234]. De plus, le transfert de lymphocytes T CD8+ immunisés contre la myéline suffit à provoquer un phénomène neuroinflammatoire semblable à la SEP chez la souris [240, 241]. Nous avons expérimentalement démontré que N1 est produite par certaines APC, facilite la prolifération des lymphocytes T CD4+ et inhibe la production de cytokines par les lymphocytes TH17. Puisque les lymphocytes T CD8+

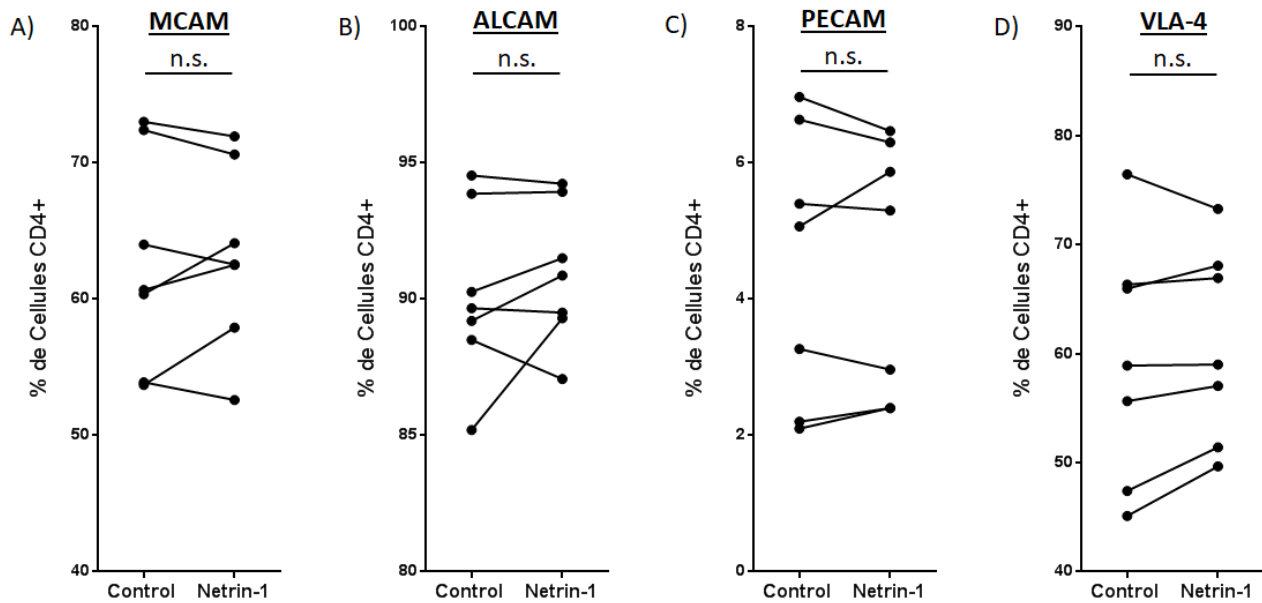


Figure 19. Nétrine-1 n'influence pas l'expression de molécules d'adhérence des lymphocytes TH1.

Des lymphocytes T CD4+ sont polarisés en TH1. Un groupe contrôle est comparé à un groupe traité avec 100 ng/mL de Nétrine-1 à jour 0. Les lymphocytes TH1 sont recueillis au jour 6, marqués avec des anticorps et analysés par cytométrie de flux. A) Le pourcentage de cellules exprimant MCAM est de 62,94% pour le groupe contrôle et de 63,01% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,5706. B) Le pourcentage de cellules exprimant ALCAM est de 90,34% pour le groupe contrôle et de 90,92% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,3200. C) Le pourcentage de cellules exprimant PECAM est de 4,43% pour le groupe contrôle et de 4,31% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,9574. D) Le pourcentage de cellules exprimant VLA-4 est de 61,78% pour le groupe contrôle et de 62,62% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,2118. N=7 donneurs. Résultats en triplicats. Test de Student apparié. $p \leq 0,05$ *.

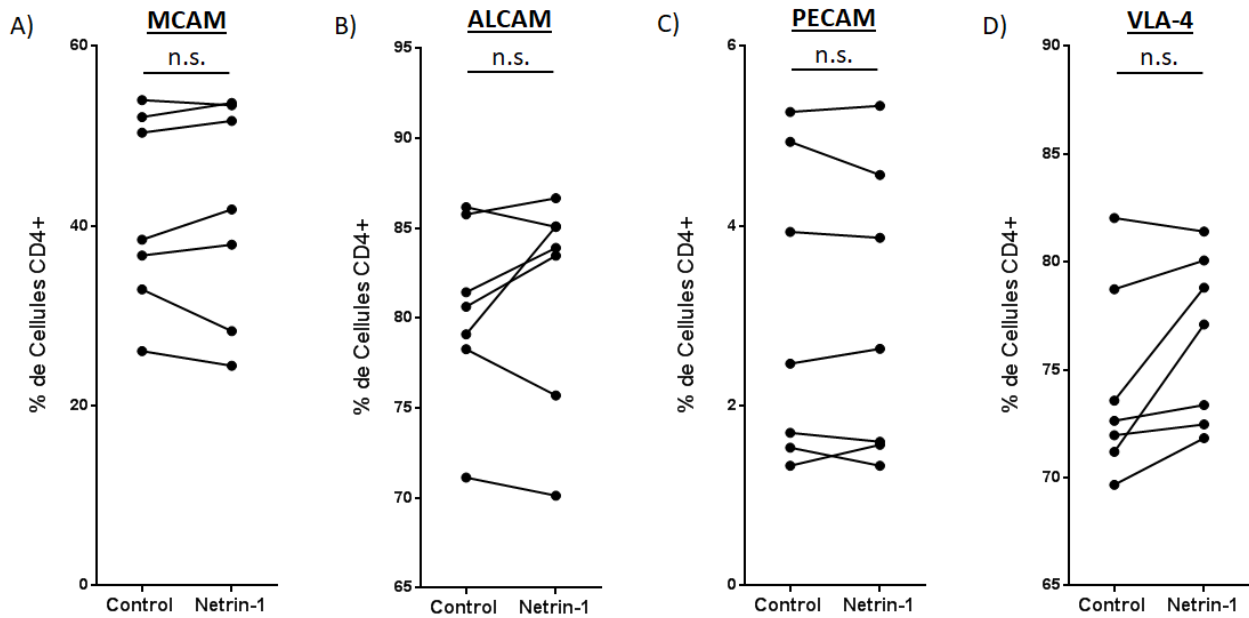


Figure 20. Nétrine-1 n'influence pas l'expression de molécules d'adhérence des lymphocytes TH17.

Des lymphocytes T CD4+ sont polarisés en TH17. Un groupe contrôle est comparé à un groupe traité avec 100 ng/mL de Nétrine-1 à jour 0. Les lymphocytes TH17 sont recueillis au jour 6, marqués avec des anticorps et analysés par cytométrie de flux. A) Le pourcentage de cellules exprimant MCAM est de 39,75% pour le groupe contrôle et de 39,56% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,9339. B) Le pourcentage de cellules exprimant ALCAM est de 80,18% pour le groupe contrôle et de 81,02% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,3691. C) Le pourcentage de cellules exprimant PECAM est de 2,71% pour le groupe contrôle et de 2,72% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,6487. D) Le pourcentage de cellules exprimant VLA-4 est de 75,02% pour le groupe contrôle et de 77,20% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,0588. N=7 donneurs. Résultats en triplicats. Test de Student apparié. $p \leq 0,05$ *.

sont également activés par des APC, il est pertinent de déterminer si N1 a une influence similaire sur cette population.

Pour mesurer l'impact de N1 sur la prolifération des lymphocytes T CD8+, nous avons extrait les lymphocytes T CD8+ totaux à partir du sang de donneurs sains. Nous avons marqué les cellules avec le CFSE, marqueur qui permet d'évaluer la prolifération cellulaire. Lors de la mitose, les molécules de CFSE sont distribuées entre les deux cellules résultantes. Il est donc possible d'estimer le nombre de cycles mitotiques qu'une cellule a subis en mesurant l'intensité du marquage CFSE. Les cellules, une fois marquées, ont été mises en culture avec un anticorps anti-CD3 OKT-3 et un anticorps anti-CD28. **(Fig.21)** Ces anticorps ont pour effet de simuler la présentation d'antigène par une APC et d'induire la prolifération des lymphocytes. La moitié des cellules fut également traitée avec 100 ng/mL de N1 et comparée aux cellules de contrôle. Il a été démontré empiriquement que les moments idéaux pour observer la prolifération sont les jours 3 et 4. **(Fig.22)** Nous avons donc recueilli les cellules à ces jours en particulier. Les cellules furent analysées par cytométrie de flux et le pourcentage de cellules en prolifération fut mesuré. **(Fig.23)**

Au jour 3, le pourcentage de cellules prolifératives est de 28,65% pour le groupe contrôle et de 30,87% pour le groupe N1, ce qui constitue une augmentation statistiquement significative avec une valeur p de 0,0150. **(Fig.24)** Au jour 4, le pourcentage de cellules prolifératives est de 65,40% pour le groupe contrôle et de 67,10% pour le groupe N1. Il ne s'agit pas d'une différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,2482. En somme, N1 augmente la prolifération des lymphocytes T CD8+ au jour 3 mais pas au jour 4.

4.7 Nétrine-1 diminue l'expression d'IL-17 et de perforine par les lymphocytes T CD8+

Dans les lésions de SEP, les lymphocytes T CD8+ exprimant IL-17 sont retrouvés en grands nombres dans les lésions actives [224]. De plus, nos résultats démontrent que N1 inhibe la production de cytokines par les lymphocytes TH17. Il est possible que N1 ait un effet semblable sur la production de cytokines par les

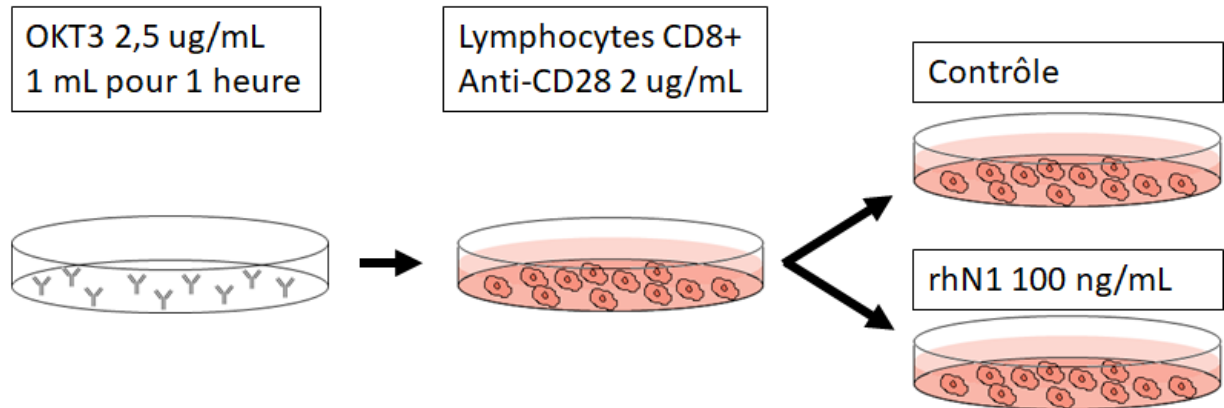
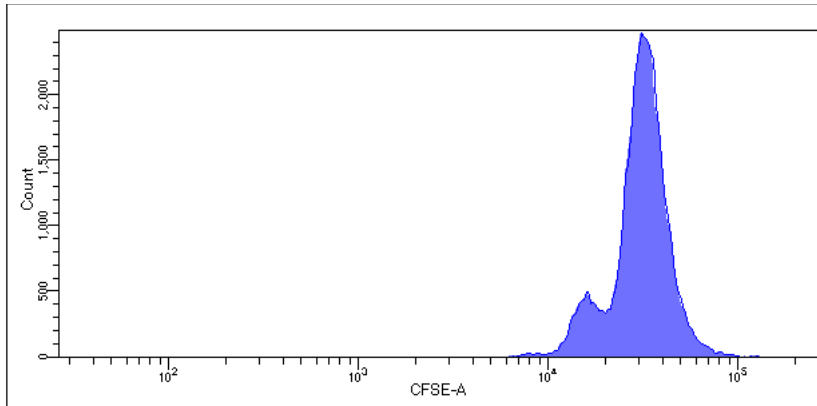


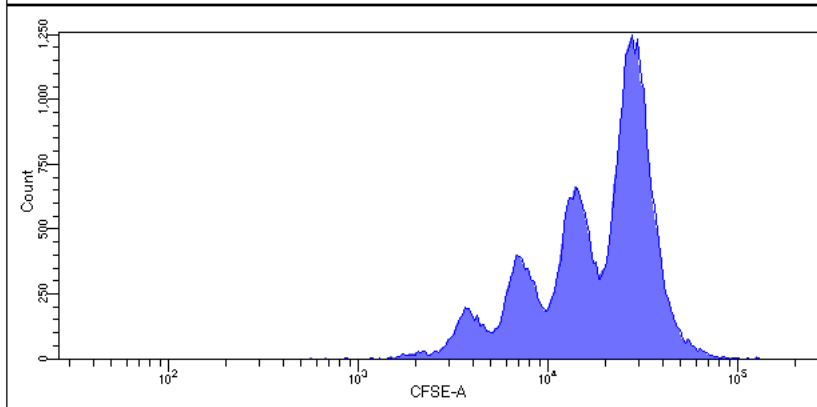
Figure 21. Protocole d'activation des lymphocytes T CD8+.

Une solution de PBS avec 2,5 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'OKT-3 est préparée et 1 mL de cette solution est déposée dans des plaques à 6 puits, avec un volume de 1 mL par puit. Les plaques sont mises à incuber à 37°C pour au moins une heure. Cette étape permet aux anticorps de se fixer au fond du puit. Les lymphocytes T CD8+ extraits du sang de donneurs sains, marqués avec le CFSE ou non, sont suspendus dans le milieu de culture auquel est ajouté 2 $\mu\text{g}/\text{mL}$ d'anticorps anti-CD28. Ces suspensions sont séparées en deux. La protéine Nétrine-1 recombinante humaine (rhN1) est ajoutée à une des deux suspensions à une concentration de 100 ng/mL. La suspension restante est utilisée comme groupe de contrôle. La solution d'OKT-3 est retirée des puits et les suspensions cellulaires y sont ajoutées. Les plaques sont mises à incuber à 37°C et seront recueillies au jour approprié.

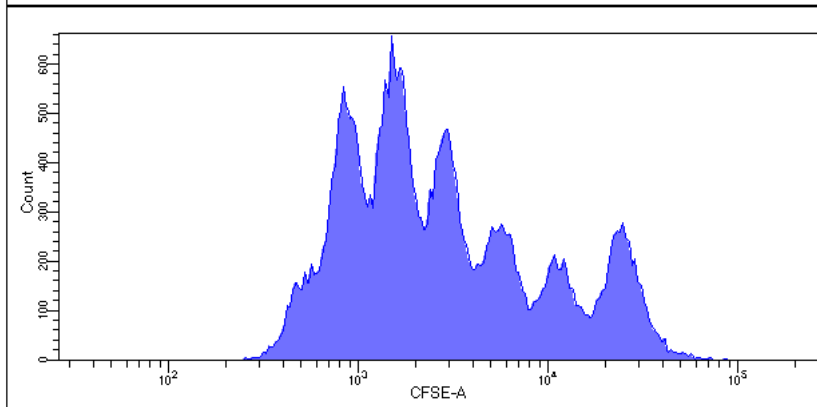
Jour 2



Jour 3



Jour 4



Jour 5

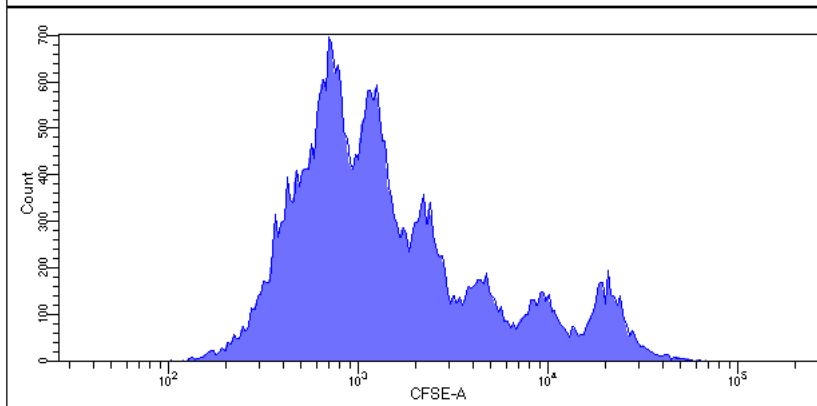


Figure 22. Le marquages CFSE est optimal aux jours 3 et 4 pour les lymphocytes T CD8+.

Les lymphocytes CD8+ sont extraits de donneurs sains et sont marqués avec le CFSE. Les cellules marquées sont mises en culture et activées. Les cellules sont recueillies aux jours 2, 3, 4 et 5 et sont analysées par cytométrie de flux. Au jour 2, on note que presque aucune cellule n'a proliféré. La prolifération cellulaire débute à peine à cette étape. Aux jours 3 et 4, on note plusieurs pics bien définis, suggérant que le nombre de cycles mitotiques complétés varie beaucoup entre les cellules. La prolifération cellulaire est débutée mais n'est pas encore achevée. Au jour 5, on note une accumulation des cellules vers les pics les plus faibles ainsi qu'un nombre de cellules non prolifératives très bas. La grande majorité de la prolifération cellulaire est complétée à cette étape.

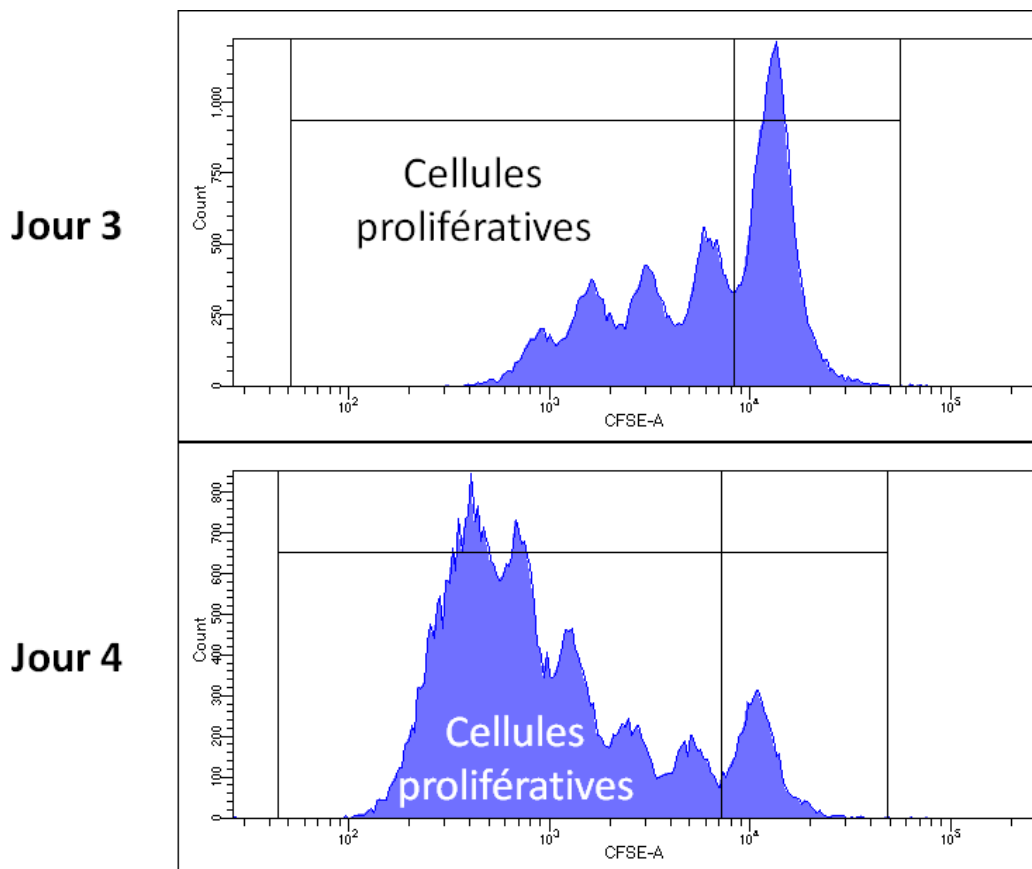


Figure 23. Stratégie de sélection des lymphocyte T CD8+ prolifératifs par marquage CFSE.

Les lymphocytes CD8+ sont extraits de donneurs sains et sont marqués avec le CFSE. Les cellules marquées sont mises en culture et activées. La moitié des cellules est traitée avec 100 ng/mL de Nétrine-1 recombinante à jour 0 et l'autre moitié sert de contrôle. Les cellules sont recueillies aux jours 3 et 4 et sont analysées par cytométrie de flux. Le pic le plus à droite représente les cellules portant la plus grande quantité du marqueur CFSE. Il s'agit des cellules qui n'ont pas proliféré et elles sont sélectionnées à part. Tous les autres pics sont sélectionnés ensemble et représentent les cellules prolifératives. Le pourcentage de cellules prolifératives est déterminé à partir de cette sélection.

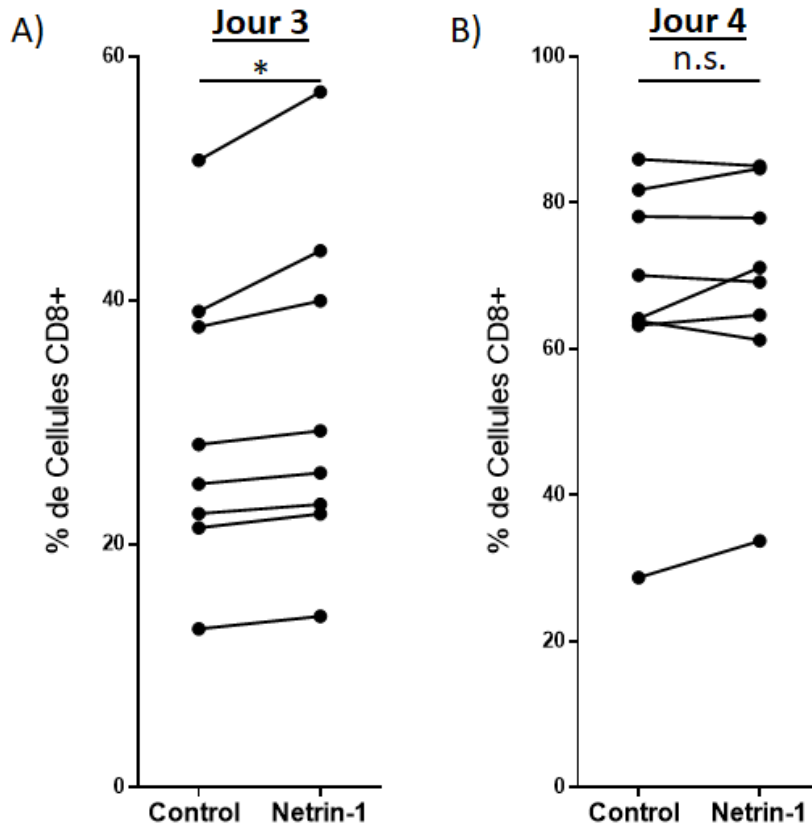


Figure 24. Nétrine-1 augmente la prolifération des lymphocytes T CD8+ activés. Des lymphocytes T CD8+ sont marqués avec CFSE et activés avec OKT-3 et α -CD28. Un groupe contrôle est comparé à un groupe traité avec 100 ng/mL de Nétrine-1 à jour 0. Les lymphocytes CD8+ activés sont recueillis aux jours 3 et 4 et analysés par cytométrie de flux. Le marquage CFSE est utilisé pour déterminer le pourcentage de cellules prolifératives par rapport au nombre total de cellules. A) Au jour 3, le pourcentage de cellules prolifératives est de 28,65% pour le groupe contrôle et de 30,87% pour le groupe Nétrine-1. Il s'agit d'une augmentation statistiquement significative, avec une valeur p de 0,0150. B) Au jour 4, le pourcentage de cellules prolifératives est de 65,40% pour le groupe contrôle et de 67,10% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,2482. N=8 donneurs pour jour 5. Test de Student apparié. $p \leq 0,05$ *.

lymphocytes T CD8+. En plus de leur production de cytokines, certaines études suggèrent que l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+ contribue à la pathogénèse de la SEP [244, 245]. L'influence de N1 sur l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+ constitue donc également une question d'intérêt.

Pour évaluer l'impact de N1 sur l'expression de cytokines et la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+, nous avons extrait les lymphocytes T CD8+ totaux du sang de donneurs sains. Les cellules furent mises en culture avec l'OKT-3 et l'anticorps anti-CD28. **(Fig.21)** La moitié des cellules furent traitées avec 100 ng/mL de N1, l'autre moitié est utilisée comme groupe de contrôle. Les cellules furent recueillies au jour 4, stimulées puis marquées pour l'expression d'IFN- γ , TNF- α , IL-17, GM-CSF, granzyme B et perforine. Les cellules furent enfin analysées par cytométrie de flux et le pourcentage de cellules exprimant les diverses molécules d'intérêt fut mesuré. **(Fig.25)**

D'une part, nous observons une légère influence de N1 sur l'expression de cytokines des lymphocytes T CD8+. **(Fig.26)** Le pourcentage de cellules exprimant IFN- γ est de 38,76% pour le groupe contrôle et de 37,89% pour le groupe N1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,3192. Le pourcentage de cellules exprimant TNF- α est de 48,71% pour le groupe contrôle et de 48,16% pour le groupe N1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,7006. Le pourcentage de cellules exprimant IL-17 est de 0,63% pour le groupe contrôle et de 0,54% pour le groupe N1. Malgré la petite différence entre les deux moyennes, il s'agit d'une diminution statistiquement significative pour le groupe N1, avec une valeur p de 0,0232. Le pourcentage de cellules exprimant GM-CSF est de 35,46% pour le groupe contrôle et de 36,16% pour le groupe N1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,6559. On observe donc uniquement une petite diminution de l'expression d'IL-17 dans le groupe N1.

D'autre part, N1 influence l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+. **(Fig.27)** Nous n'observons pas de différence pour granzyme B. Le pourcentage de cellules exprimant granzyme B est de 68,34% pour le groupe contrôle et de 69,25% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,6629. Le résultat est toutefois

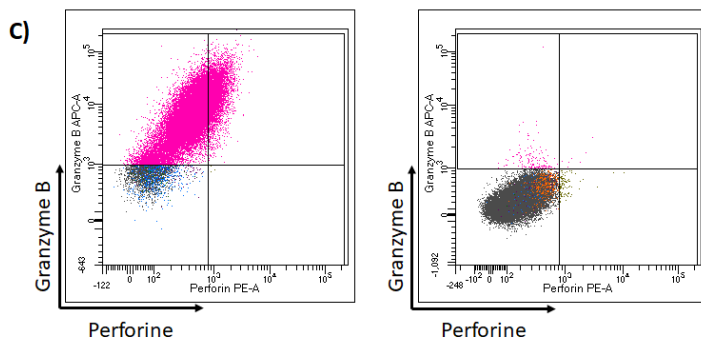
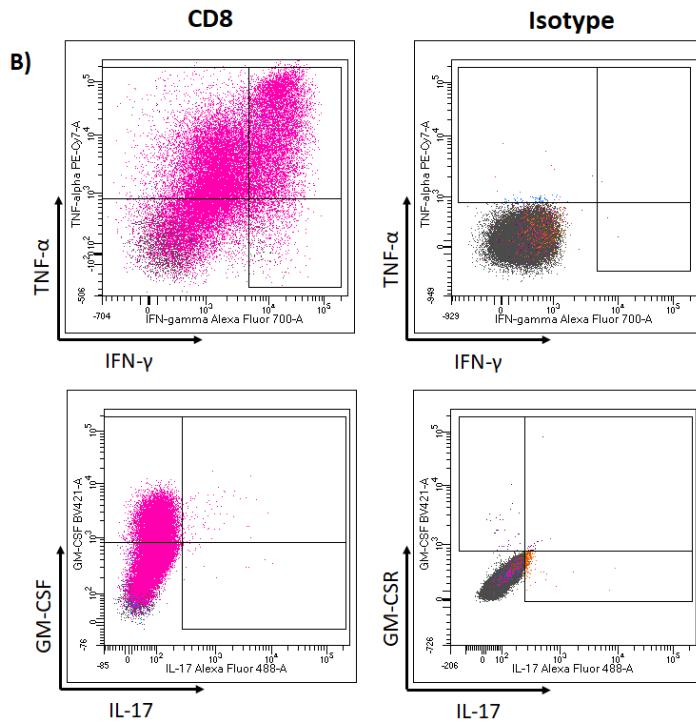
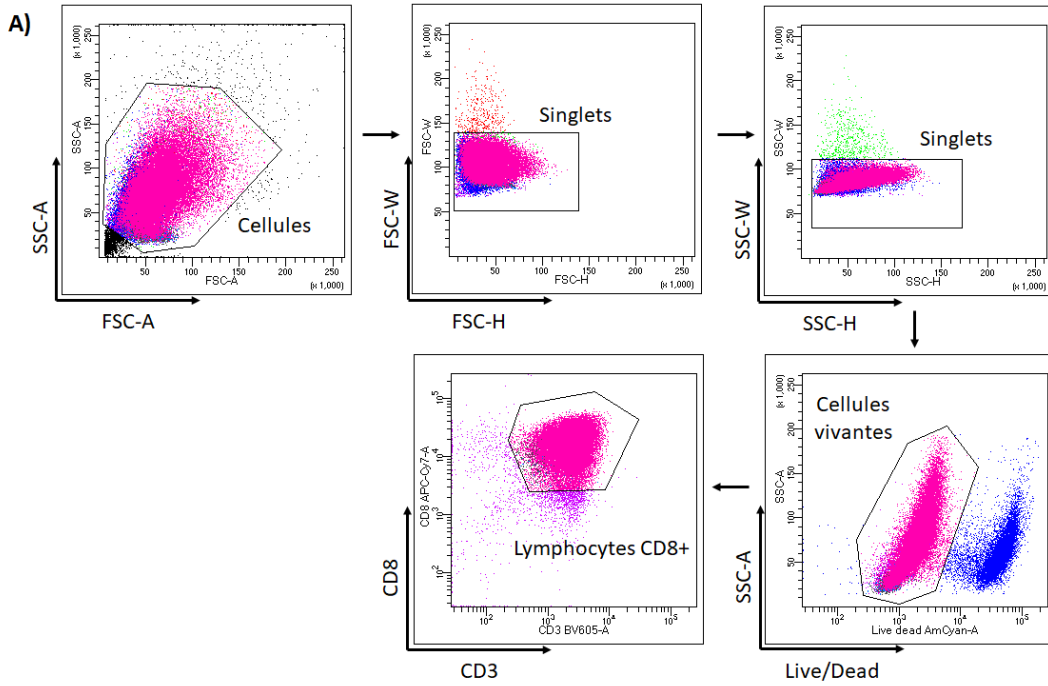


Figure 25. Stratégie de sélection des lymphocytes T CD8+ pour la mesure de l'expression des cytokines, granzyme B et perforine.

Les lymphocytes CD8+ sont extraits de donneurs sains et sont mis en culture et activés. La moitié des cellules est traitée avec 100 ng/mL de Nétrine-1 recombinante à jour 0 et l'autre moitié sert de contrôle. Les cellules sont recueillies au jour 4 et sont marquées pour IFN- γ , TNF- α , IL-17, GM-CSF, granzyme B et perforine. Les cellules sont analysées par cytométrie de flux. A) Stratégie de sélection des cellules. B) Pour la mesure des cytokines, les cellules sont sélectionnées en fonction d'un isotype et de la morphologie des populations. Le pourcentage de cellules exprimant chaque cytokine est déterminé pour chaque échantillon. C) Pour la mesure de granzyme B et perforine, les cellules sont sélectionnées en fonction d'un isotype.

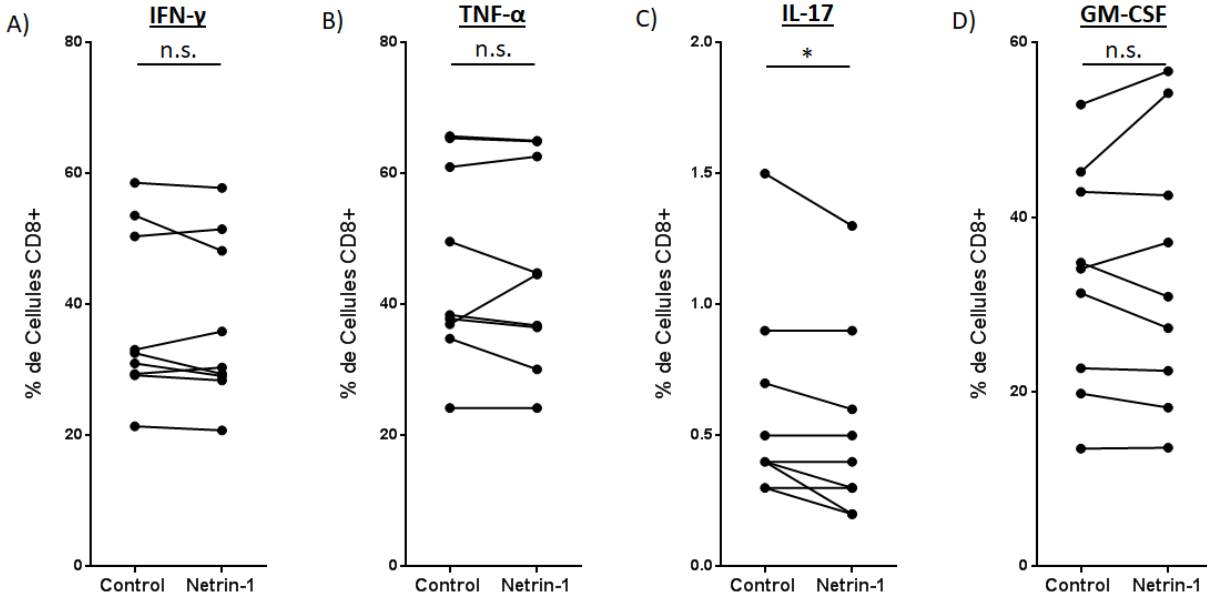


Figure 26. Nétrine-1 diminue la production d'IL-17 par les lymphocytes T CD8+ activés.

Des lymphocytes T CD8+ sont activés avec OKT-3 et α -CD28. Un groupe contrôle est comparé à un groupe traité avec 100 ng/mL de Nétrine-1 à jour 0. Les lymphocytes CD8+ activés sont recueillis au jour 4, marqués avec des anticorps et analysés par cytométrie de flux. A) Le pourcentage de cellules exprimant IFN- γ est de 38,76% pour le groupe contrôle et de 37,89% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,3192. B) Le pourcentage de cellules exprimant TNF- α est de 48,71% pour le groupe contrôle et de 48,16% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,7006. C) Le pourcentage de cellules exprimant IL-17 est de 0,63% pour le groupe contrôle et de 0,54% pour le groupe Nétrine-1. On observe une diminution statistiquement significative du groupe Nétrine-1, avec une valeur p de 0,0232. D) Le pourcentage de cellules exprimant GM-CSF est de 35,46% pour le groupe contrôle et de 36,16% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,6559. N=9 donneurs. Test de Student apparié. $p \leq 0,05$ *.

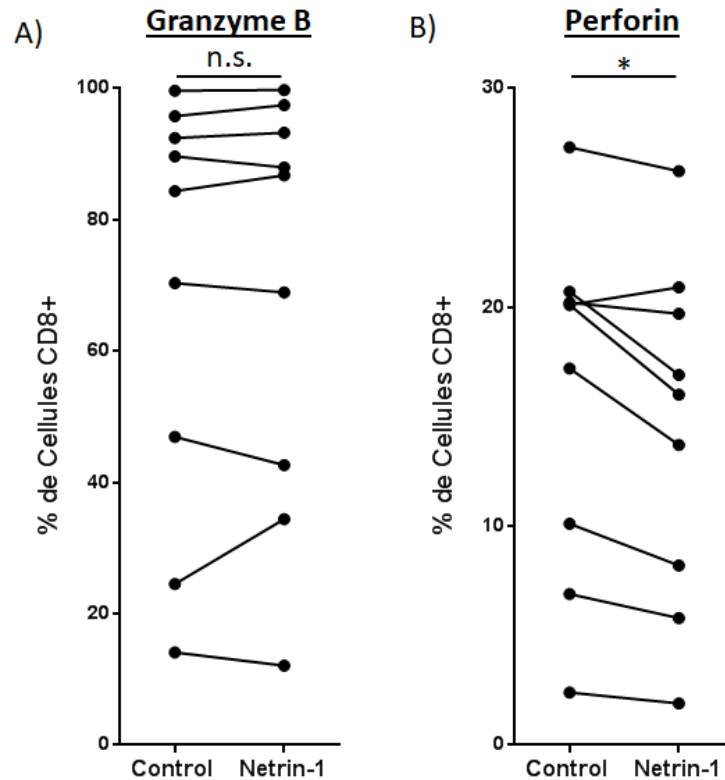


Figure 27. Nétrine-1 diminue la production de perforine mais pas de granzyme B par les lymphocytes T CD8+ activés.

Des lymphocytes T CD8+ sont activés avec OKT-3 et α -CD28. Un groupe contrôle est comparé à un groupe traité avec 100 ng/mL de Nétrine-1 à jour 0. Les lymphocytes CD8+ activés sont recueillis au jour 4, marqués avec des anticorps et analysés par cytométrie de flux. A) Le pourcentage de cellules exprimant granzyme B est de 68,34% pour le groupe contrôle et de 69,25% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,6629. B) Le pourcentage de cellules exprimant perforine est de 17,26% pour le groupe contrôle et de 15,44% pour le groupe Nétrine-1. Il s'agit d'une diminution statistiquement significative dans le groupe Nétrine-1, avec une valeur p de 0,0154. N=9 donneurs. Test de Student apparié. $p \leq 0,05$ *.

différent pour perforine. Le pourcentage de cellules exprimant perforine est de 17,26% pour le groupe contrôle et de 15,44% pour le groupe N1. Il s'agit d'une diminution statistiquement significative dans le groupe N1, avec une valeur p de 0,0154. En somme, N1 diminue la production de perforine par les lymphocytes T CD8+.

4.8 Nétrine-1 n'influence pas l'expression de molécules d'adhérence par les lymphocytes T CD8+

Une étude suggère que les lymphocytes T CD8+ expriment MCAM, ce qui a pour effet de faciliter leur migration à travers la BHE [208]. Bien que nos résultats ne démontrent pas d'influence de N1 sur l'expression de molécules d'adhérence par les lymphocytes TH1 et TH17, nous ne pouvons exclure que cette influence existe pour les lymphocytes T CD8+.

Pour évaluer l'impact de N1 sur l'expression de molécules d'adhérence par les lymphocytes T CD8+, nous avons extrait les lymphocytes T CD8+ totaux du sang de donneurs sains. Les cellules furent mises en culture avec l'OKT-3 et l'anticorps anti-CD28. **(Fig.21)** La moitié des cellules furent traitées avec 100 ng/mL de N1, l'autre moitié fut utilisée comme groupe de contrôle. Les cellules furent recueillies au jour 4 puis marquées pour l'expression de MCAM, ALCAM, VLA-4 et PECAM. Les cellules furent enfin analysées par cytométrie de flux et le pourcentage de cellules exprimant les diverses molécules d'intérêt fut mesuré. **(Fig.28)**

Nos résultats ne mettent en évidence aucune différence. **(Fig.29)** Le pourcentage de cellules exprimant MCAM est de 19,56% pour le groupe contrôle et de 18,93% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,7560. Le pourcentage de cellules exprimant ALCAM est de 39,06% pour le groupe contrôle et de 40,56% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,1662. Le pourcentage de cellules exprimant PECAM est de 7,47% pour le groupe contrôle et de 7,49% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,7793. Le pourcentage de cellules exprimant VLA-4 est de 87,93% pour le groupe contrôle et de 87,69% pour le groupe N1, résultant en une valeur p de 0,7598. En somme, N1 n'influence pas l'expression de molécules d'adhérence des lymphocytes T CD8+.

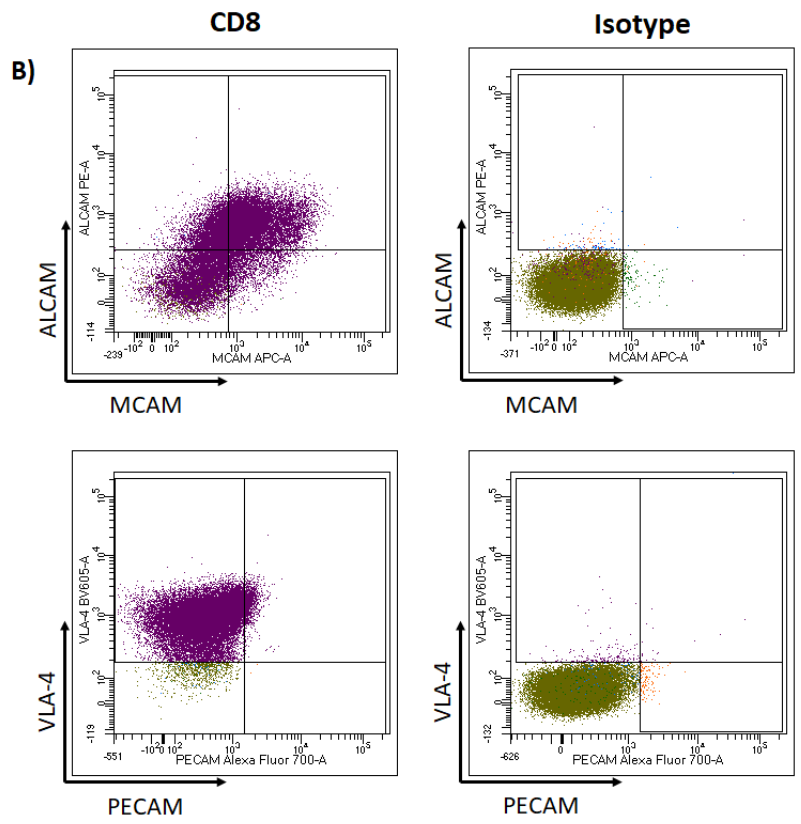
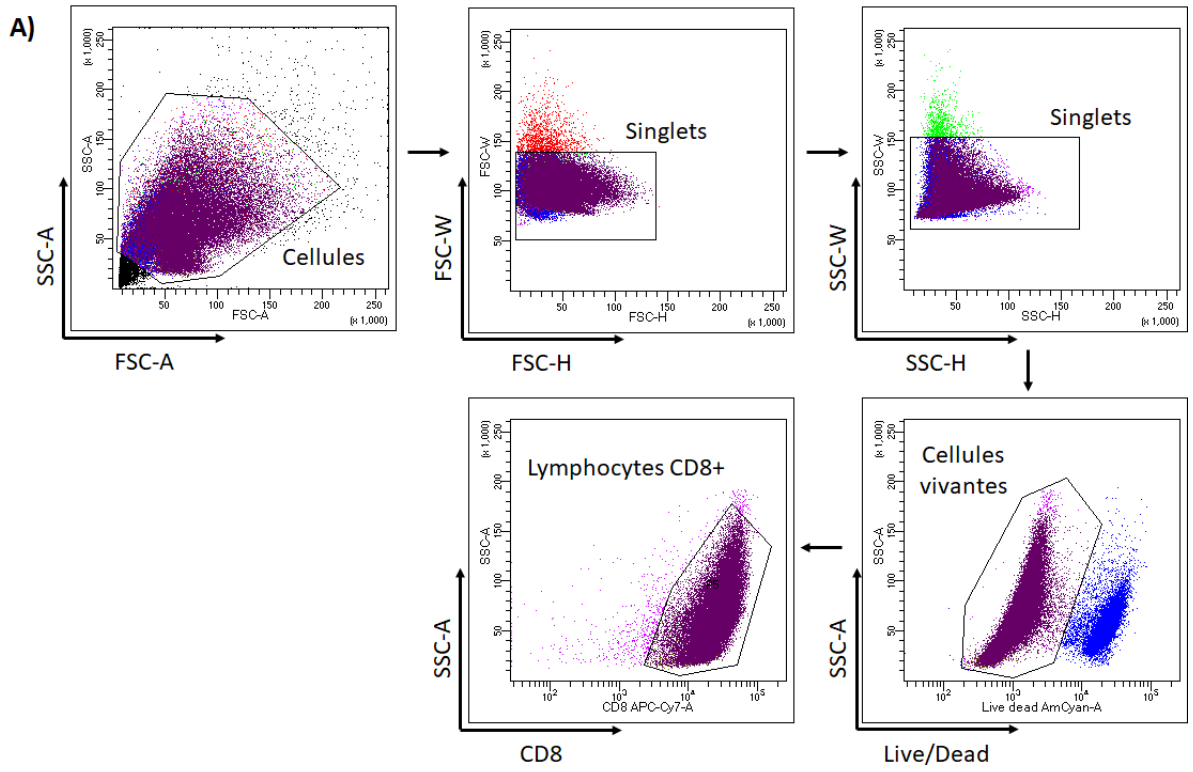


Figure 28. Stratégie de sélection des lymphocytes T CD8+ pour la mesure de l'expression des molécules d'adhérence.

Les lymphocytes CD8+ sont extraits de donneurs sains et sont activés. La moitié des cellules est traitée avec 100 ng/mL de Nétrine-1 recombinante à jour 0 et l'autre moitié sert de contrôle. Les cellules sont recueillies au jour 4 et sont marquées pour MCAM, ALCAM, PECAM et VLA-4. Les cellules sont analysées par cytométrie de flux. A) Stratégie de sélection des cellules. B) Pour la mesure des molécules d'adhérence, les cellules sont sélectionnées en fonction d'un isotype. Le pourcentage de cellules exprimant chaque molécule d'adhérence est déterminé pour chaque échantillon.

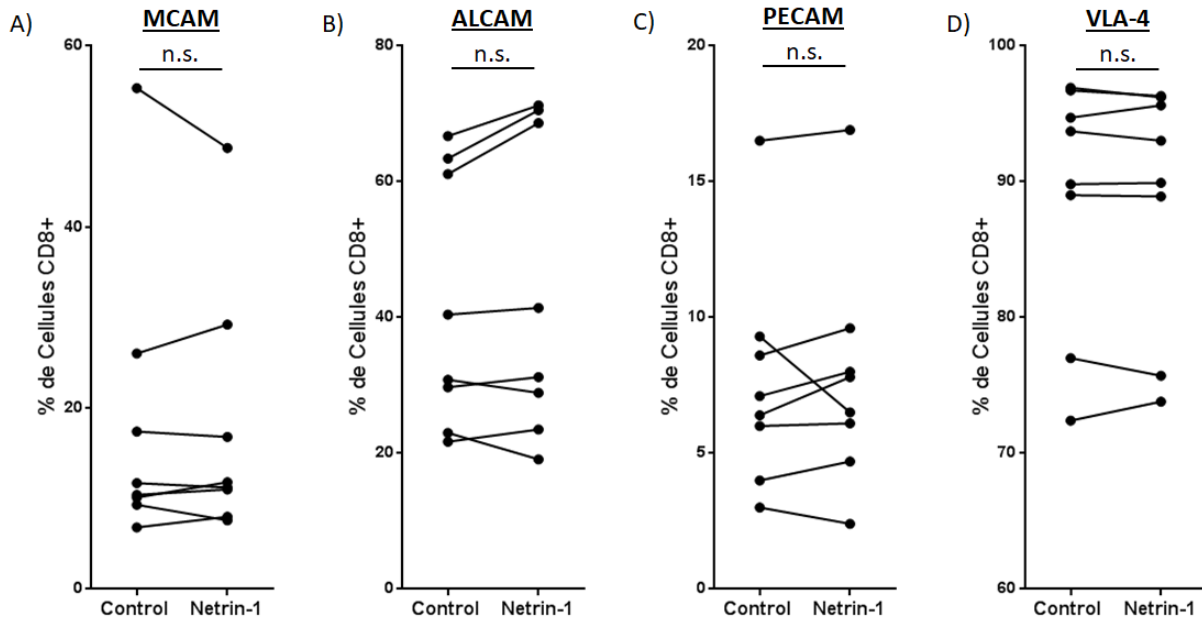


Figure 29. Nétrine-1 n'influence pas l'expression de molécules d'adhérence des lymphocytes T CD8+ activés.

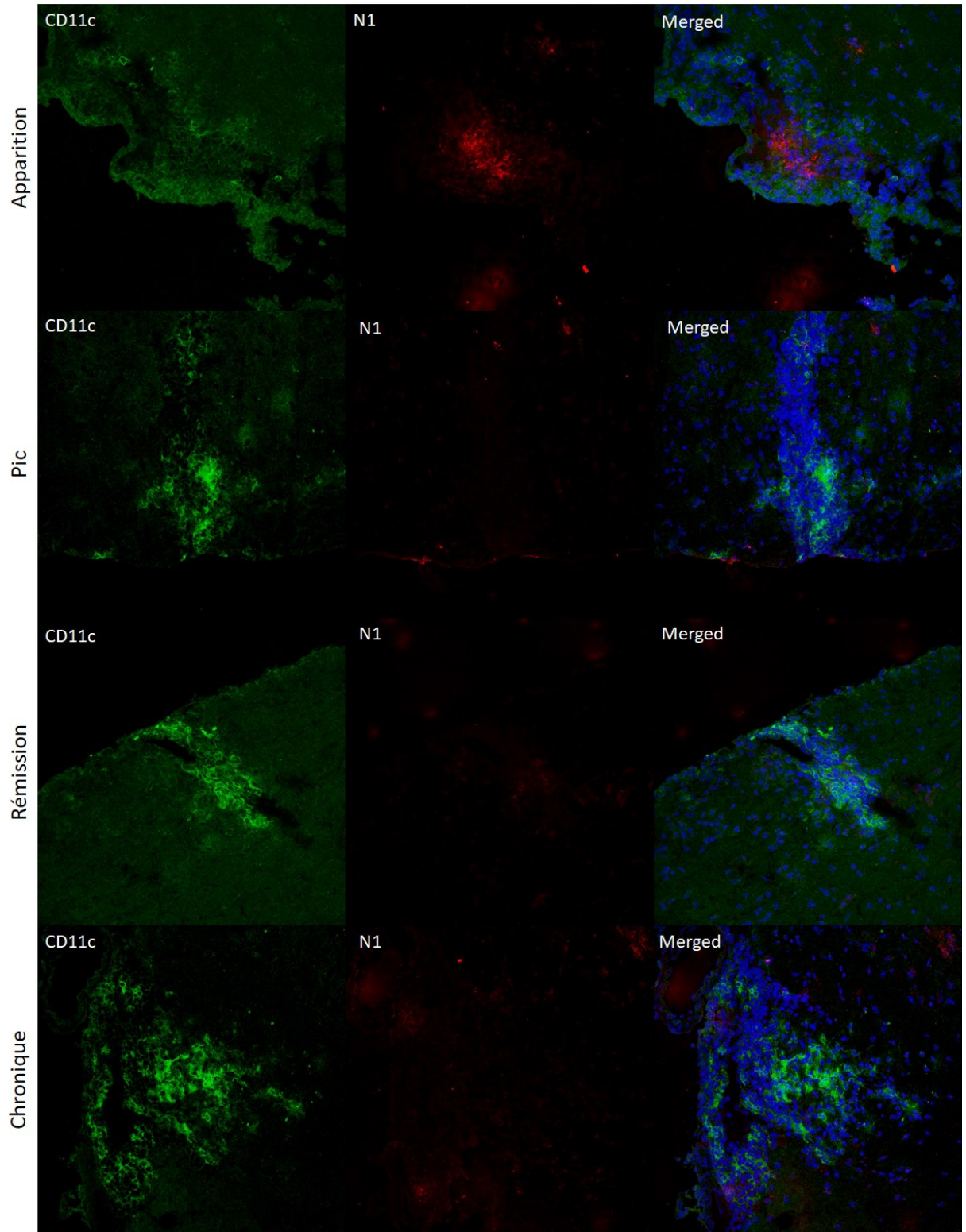
Des lymphocytes T CD8+ sont activés avec OKT-3 et α -CD28. Un groupe contrôle est comparé à un groupe traité avec 100 ng/mL de Nétrine-1 à jour 0. Les lymphocytes CD8+ activés sont recueillis au jour 4, marqués avec des anticorps et analysés par cytométrie de flux. A) Le pourcentage de cellules exprimant MCAM est de 19,56% pour le groupe contrôle et de 18,93% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,7560. B) Le pourcentage de cellules exprimant ALCAM est de 39,06% pour le groupe contrôle et de 40,56% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,1662. C) Le pourcentage de cellules exprimant PECAM est de 7,47% pour le groupe contrôle et de 7,49% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,7793. D) Le pourcentage de cellules exprimant VLA-4 est de 87,93% pour le groupe contrôle et de 87,69% pour le groupe Nétrine-1. Il n'y a pas de différence statistiquement significative, avec une valeur p de 0,7598. N=9 donneurs. Test de Student apparié. $p \leq 0,05$

4.9 Nétrine-1 n'est pas exprimée par les cellules présentatrices d'antigènes du système nerveux central durant l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale

Nous avons démontré que les mDC et les macrophages M1 expriment N1. Nous avons également démontré que N1 favorise la prolifération des lymphocytes TH1, TH17 et CD8+, diminue la production de cytokines des lymphocytes TH17 et CD8+ et diminue la cytotoxicité des lymphocytes T CD8+. Toutefois, ces résultats sont tous le produit d'expériences *in vitro*. Nous avons tenté de prouver que la voie N1 était impliquée dans le fonctionnement des APC *in vivo* en utilisant des marquages d'immunofluorescence sur des tissus de souris EAE. L'utilisation de ce modèle comporte plusieurs avantages. Notamment, la plus grande disponibilité des tissus et la possibilité de corréler les observations histologiques aux stades cliniques de la maladie. De plus, le marqueur CD11c permet d'aisément reconnaître les DC chez la souris, ce qui n'est pas le cas chez l'humain. Enfin, la démonstration de l'expression de N1 par les APC en EAE ouvre la porte à diverses expériences permettant de démontrer l'importance fonctionnelle de l'axe N1 *in vivo*.

Pour évaluer l'expression de N1 par les APC en EAE, nous avons utilisé les cerveaux et moelles épinières de plusieurs animaux sacrifiés à 4 stades cliniques de la maladie : Apparition, pic, rémission et chronique. Les organes ont été congelés et coupés avec un cryostat, où 3 sections ont été appliquées par lame. Nous avons ensuite examiné les sections avec un marquage d'immunofluorescence. Pour révéler les APC, nous avons utilisé le marqueur CD11c pour les DC et le marqueur Iba-1 pour les macrophages et cellules microgliales. Nous avons marqué les sections pour N1 et utilisé le marqueur nucléaire Topro-3. Nous avons examiné les lésions à la recherche de co-marquage pour N1 et un marqueur d'APC par microscopie confocale.

De manière générale, nous n'avons pas observé d'expression de N1 par les APC. Pour les DC, le marquage CD11c était clair et aisément identifiable. Nous n'avons toutefois pas remarqué de co-marquage avec N1 ni dans le cerveau, **(Fig.30)** ni dans la moelle épinière, **(Fig.31)** et ce, à aucun des stades de la maladie. Pour les macrophages/microglie, le marquage Iba-1 était positif, même si nous observions du



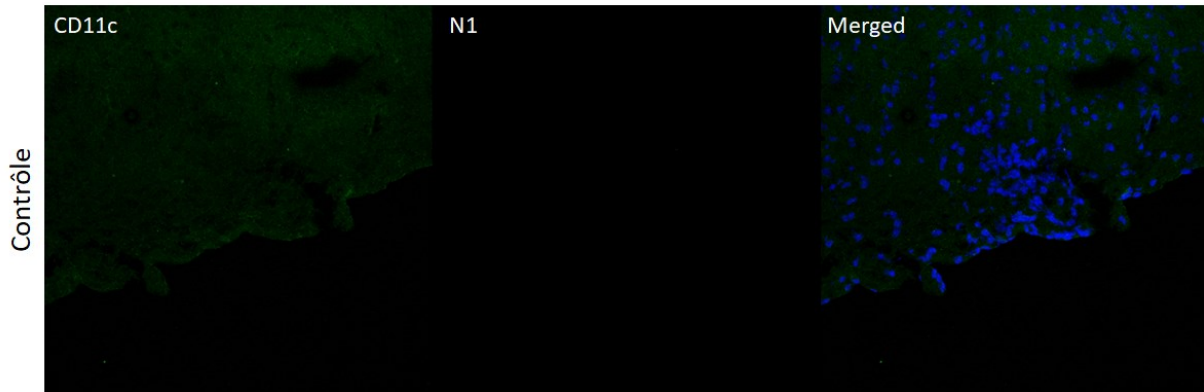
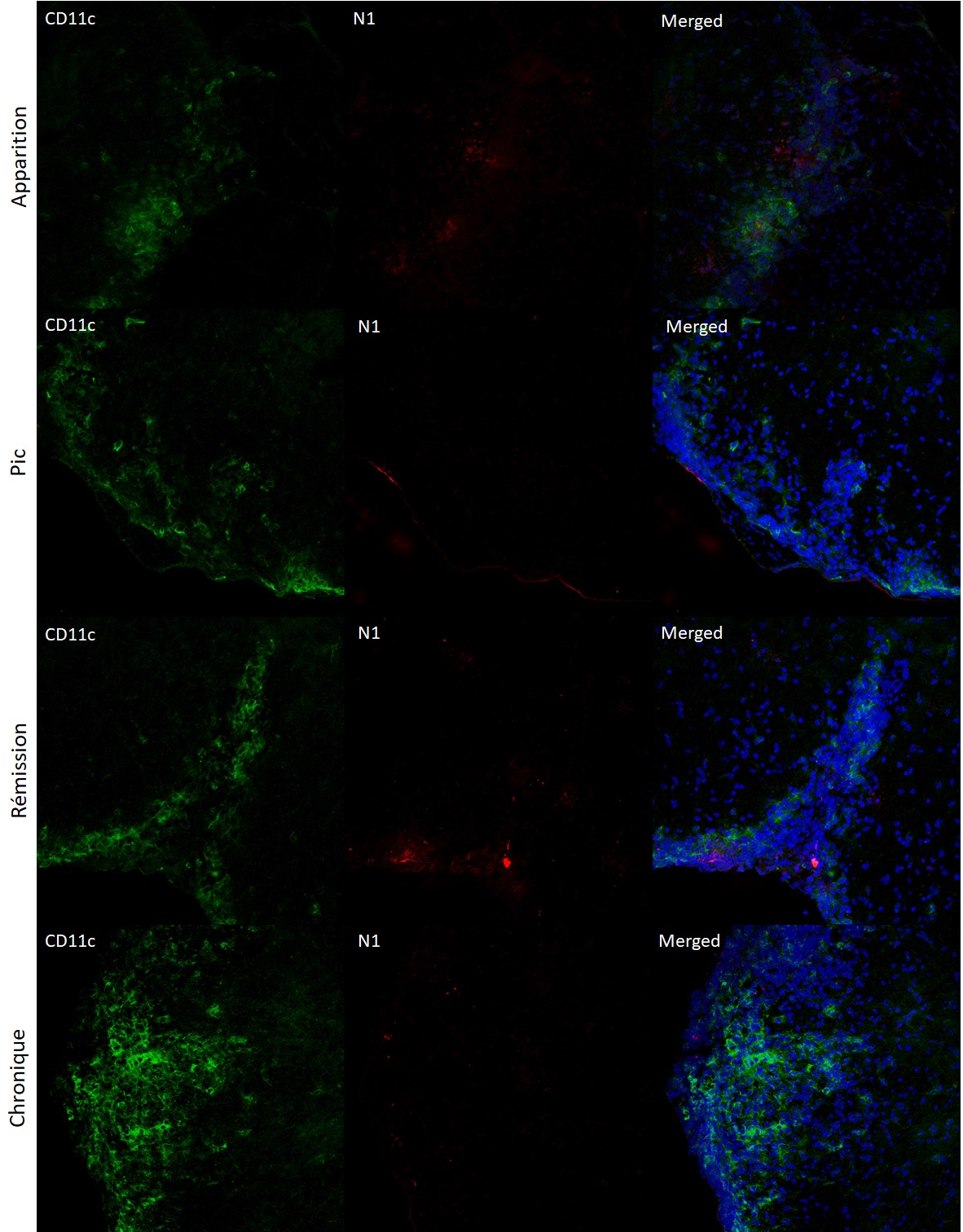


Figure 30. Nétrine-1 n'est pas exprimée par les cellules dendritiques dans le cerveau lors de l'EAE.

Les cerveaux de souris EAE sont recueillis à différents stades de la maladie : Apparition, pic, rémission et chronique. Les cerveaux sont congelés puis des sections sont coupées à l'aide d'un cryostat et 3 sections sont mises par lame. Les sections sont marquées par immunohistochimie. CD11c (marqueur de cellules dendritiques) pour AF488 (vert), Nétrine-1 (N1) pour Cy3 (rouge). Topro-3 est utilisé comme marqueur nucléaire (bleu). Pour le contrôle, une section par lame est incubée uniquement avec les anticorps secondaires. Les capteurs pour AF488 et Cy3 sont ajustés en fonction du point de plus forte émission présente sur les échantillons. Les images sont prises au niveau de lésions présentes sur le tronc cérébral. Nous n'observons pas de co-marquage pour CD11c et N1 à aucun des stades de la maladie, suggérant que N1 n'est pas exprimée par les cellules dendritiques dans le cerveau en EAE. N=1 animal par stade.



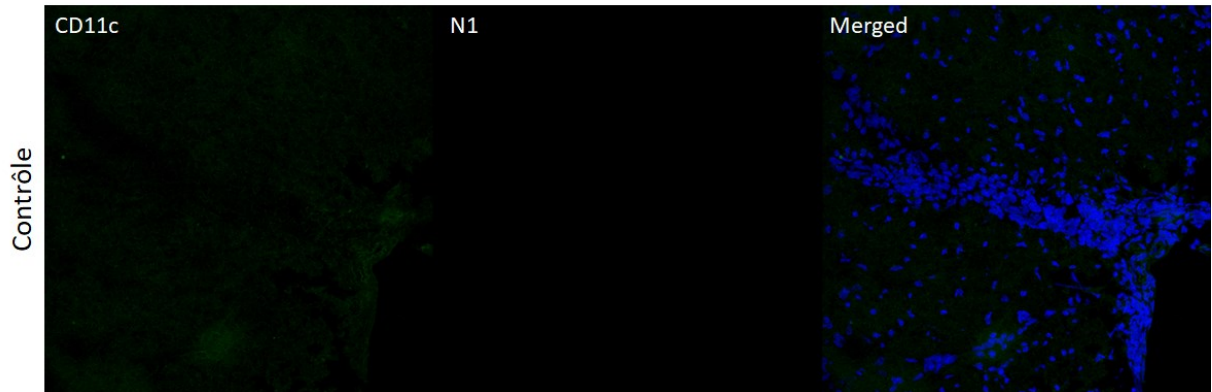


Figure 31. Nétrine-1 n'est pas exprimée par les cellules dendritiques dans la moelle épinière lors de l'EAE.

Les moelles épinières de souris EAE sont recueillies à différents stades de la maladie : Apparition, pic, rémission et chronique. Les moelles épinières sont congelées puis des sections sont coupées à l'aide d'un cryostat et 3 sections sont mises par lame. Les sections sont marquées par immunohistochimie. CD11c (marqueur de cellules dendritiques) pour AF488 (vert), Nétrine-1 (N1) pour Cy3 (rouge). Topro-3 est utilisé comme marqueur nucléaire (bleu). Pour le contrôle, une section par lame est incubée uniquement avec les anticorps secondaires. Les capteurs pour AF488 et Cy3 sont ajustés en fonction du point de plus forte émission présente sur les échantillons. Nous n'observons pas de co-marquage pour CD11c et N1 à aucun des stades de la maladie, suggérant que N1 n'est pas exprimée par les cellules dendritiques dans la moelle épinière en EAE. N=1 animal par stade.

signal non spécifique. Nous n'avons pas remarqué de co-marquage avec N1 ni dans le cerveau, (**Fig.32**) ni dans la moelle épinière, (**Fig.33**) et ce, à aucun des stades de la maladie. Ces marquages n'ont pas été effectués sur le SNC de souris non-immunisées, mais les cerveaux de souris sacrifiées au stage pré-symptomatique, entre l'immunisation et le développement des symptômes, ne démontraient pas de co-marquage pour N1 avec CD11c ou Iba-1 dans le cerveau ou la moelle épinière. Ces résultats suggèrent que N1 n'est pas exprimé par les APC dans le SNC des souris en EAE.

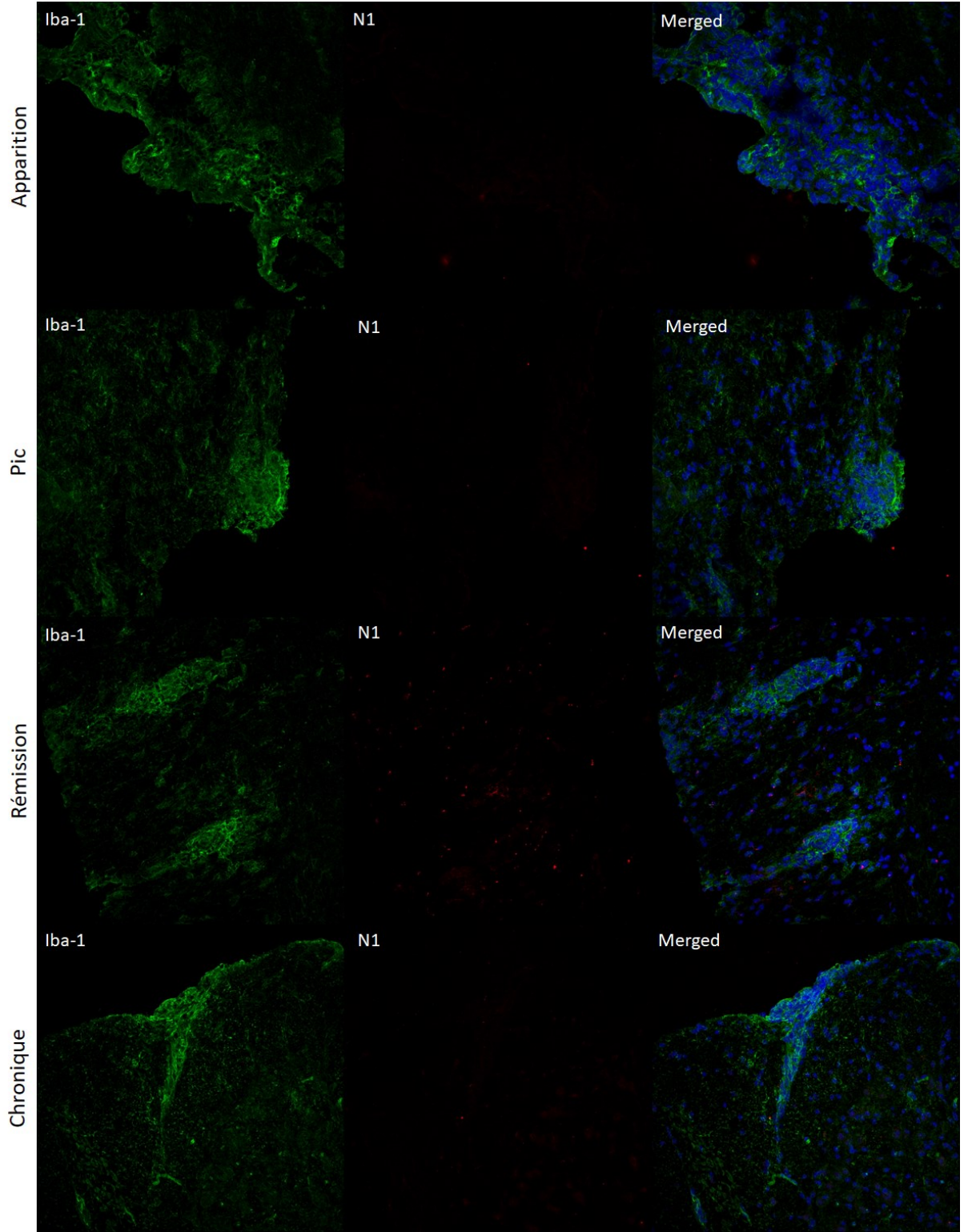




Figure 32. Nétrine-1 n'est pas exprimée par les macrophages dans le cerveau lors de l'EAE.

Les cerveaux de souris EAE sont recueillis à différents stades de la maladie : Apparition, pic, rémission et chronique. Les cerveaux sont congelés puis des sections sont coupées à l'aide d'un cryostat et 3 sections sont mises par lame. Les sections sont marquées par immunohistochimie. Iba-1 (marqueur de macrophages/microglie) pour AF488 (vert), Nétrine-1 (N1) pour Cy3 (rouge). Topro-3 est utilisé comme marqueur nucléaire (bleu). Pour le contrôle, une section par lame est incubée uniquement avec les anticorps secondaires. Les capteurs pour AF488 et Cy3 sont ajustés en fonction du point de plus forte émission présente sur les échantillons. Les images sont prises au niveau de lésions présentes sur le tronc cérébral. Nous n'observons pas de co-marquage pour Iba-1 et N1 à aucun des stades de la maladie, suggérant que N1 n'est pas exprimée par les macrophages ou la microglie dans le cerveau en EAE. N=1 animal par stade.

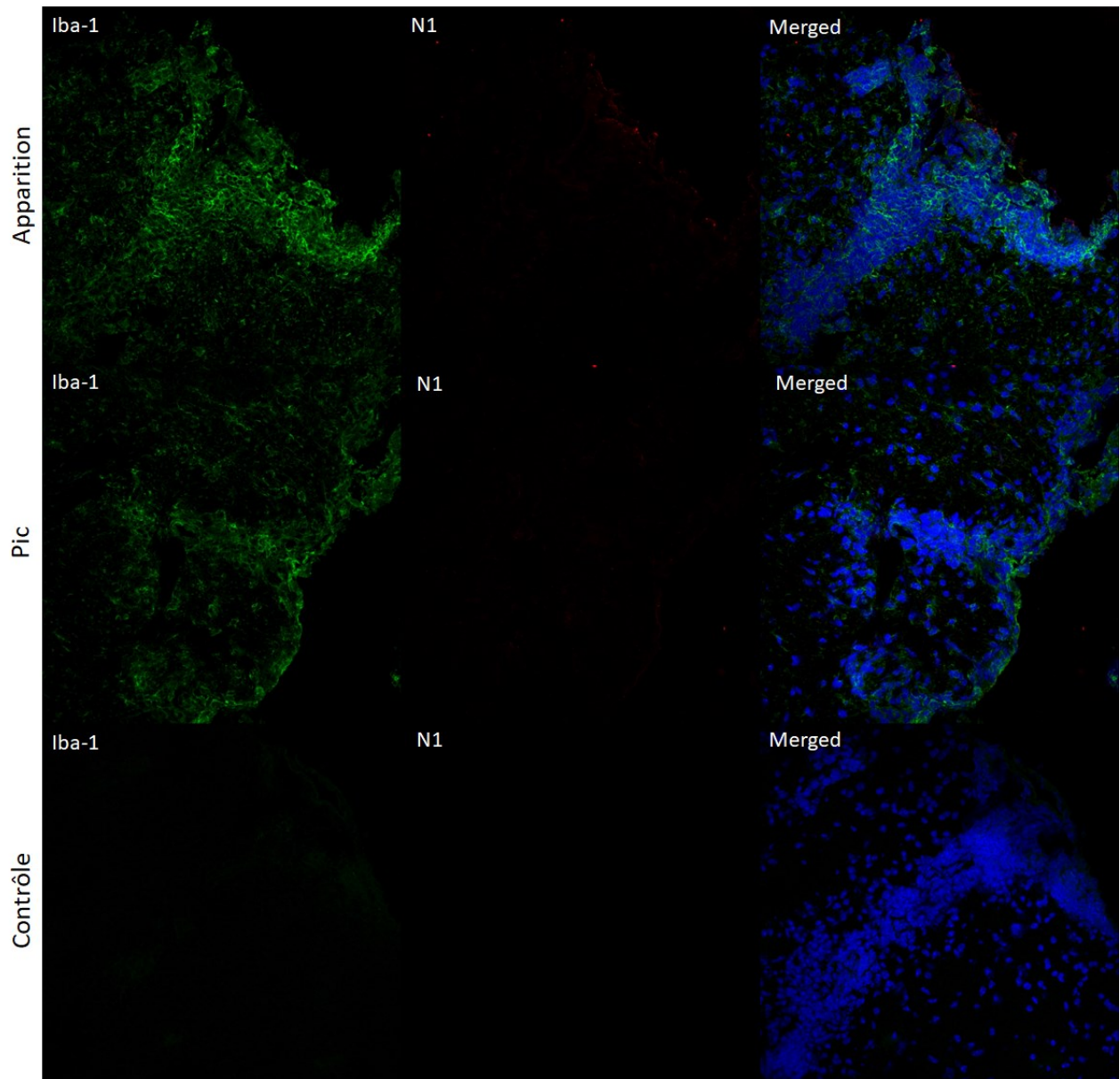


Figure 33. Nétrine-1 n'est pas exprimée par les macrophages dans la moelle épinière lors de l'EAE.

Les moelles épinières de souris EAE sont recueillies à différents stades de la maladie : Apparition et pic. Ces stades ont été sélectionnés car ils offraient la meilleure visualisation des lésions. Les moelles épinières sont congelées puis des sections sont coupées à l'aide d'un cryostat et 3 sections sont mises par lame. Les sections sont marquées par immunohistochimie. Iba-1 (marqueur de macrophages/microglie) pour

AF488 (vert), Nétrine-1 (N1) pour Cy3 (rouge). Topro-3 est utilisé comme marqueur nucléaire (bleu). Pour le contrôle, une section par lame est incubée uniquement avec les anticorps secondaires. Les capteurs pour AF488 et Cy3 sont ajustés en fonction du point de plus forte émission présente sur les échantillons. Nous n'observons pas de co-marquage pour Iba-1 et N1 à aucun des stades de la maladie, suggérant que N1 n'est pas exprimée par les macrophages ou la microglie dans la moelle épinière en EAE. N=1 animal par stade.

5. Discussion

5.1 Validité Technique des Résultats

Le premier objectif du projet était de caractériser l'expression de N1 par les APC. Nous avons démontré par qPCR que l'ARN de N1 était absent des monocytes, exprimé faiblement par les iDC et exprimé fortement par les mDC. De plus, nous avons démontré la présence d'ARN de N1 chez les macrophages M1, mais pas chez les macrophages M2. Nous avons observé une certaine variabilité entre les différents résultats, mais ces derniers ont été faits en triplicatas, ce qui aura pour effet de diminuer la variabilité imputable à des facteurs techniques. Il est possible que cette variabilité soit imputable à des divergences physiologiques entre les donneurs. La validité des résultats par qPCR est confirmée par la similarité des résultats de l'analyse par immunobuvardage. Nous avons remarqué une absence d'expression de N1 par les monocytes, une bande faible ou indétectable pour les iDC et une forte bande pour les mDC. Au niveau des contrôles positifs, on peut remarquer que la bande de la protéine recombinante est légèrement plus élevée que la bande des cellules endothéliales inflammées. Le document d'information fourni par la compagnie qui produit la protéine recombinante indique que la protéine a un poids moléculaire d'environ 80-85 kda lors de l'électrophorèse, alors que ce même document précise que la protéine N1, de manière générale, a un poids moléculaire de 75 kda. Cette différence est donc probablement imputable à une caractéristique de la protéine recombinante qui est connue du fabricant. Un autre fait notable est la basse intensité de la bande d'actine des monocytes. Il doit être considéré que les résultats montrés ne sont pas une exception. Les monocytes expriment de manière reproductible une bande d'actine relativement petite comparativement aux autres types cellulaires. La concentration en protéines des échantillons de monocytes fut mesurée à plusieurs reprises et de pair avec celle des autres échantillons. Il est donc peu probable que la concentration ait été surestimée à chaque fois, résultant en l'analyse d'échantillons systématiquement trop pauvres en protéine. Il est davantage plausible que l'actine soit exprimée différemment par les monocytes et qu'elle

représente donc un contrôle non optimal pour ce type cellulaire. Malgré ces irrégularités, nous sommes tout de même en mesure de démontrer de façon convaincante que l'expression de la protéine N1 est augmentée chez les mDC comparativement aux iDC.

Nous avons également caractérisé l'expression de N1 par les macrophages. Autant pour le qPCR que pour l'immunobuvardage, nous avons remarqué que N1 était fortement exprimée par les macrophages M1, mais était complètement absente chez les macrophages M2. À l'instar des DC, la concordance entre qPCR et immunobuvardage contribue à la fiabilité des résultats.

Le second objectif du projet était d'évaluer l'influence de N1 sur le fonctionnement des lymphocytes T. Pour ce faire, nous avons utilisé des lymphocytes T CD4+ et CD8+ totaux. Pour les lymphocytes T CD4+, nous avons adapté notre protocole d'activation et de différenciation d'un article qui employait des cellules mémoires [207]. Toutefois, une étude murine ayant démontré une influence de N1 sur la production de cytokines par les lymphocytes T CD4+ utilisait des lymphocytes T CD4+ totaux [277]. Afin d'étudier l'analogie humaine de ce phénomène, nous avons employé le même type de cellules. Pour les lymphocytes T CD8+, notre protocole est adapté d'un article qui utilise des lymphocytes T CD8+ totaux [208].

Nous avons évalué l'impact de N1 sur la prolifération des lymphocytes TH1, TH17 et CD8+ activés en utilisant le marquage CFSE. Pour les lymphocytes TH1 et TH17, nous avons observé une augmentation de la prolifération au jour 5, mais pas au jour 4. Pour les lymphocytes T CD8+, nous avons observé une augmentation de la prolifération au jour 3, mais pas au jour 4. Dans les deux cas, une augmentation peut être observée seulement un jour sur deux. Deux principaux phénomènes peuvent expliquer cette différence. D'une part, il est possible que des facteurs techniques soient en cause. Il est possible que la protéine N1 ait été entièrement dégradée au jour 5 ou que les cellules aient consommé la majorité des nutriments présents dans le milieu, plafonnant la prolifération cellulaire. Il est aussi possible que les cellules n'aient tout simplement pas eu suffisamment de

temps pour proliférer au jour 3, dissimulant l'influence de N1. D'autre part, il est possible que cette différence soit imputable à une variation de l'expression des récepteurs de N1 par les lymphocytes T en cours d'expérience. Il a déjà été démontré que les lymphocytes T CD4+ augmentent graduellement leur expression du récepteur néogénine et, dans une moindre mesure, du récepteur UNC5B, à la suite de leur activation [276]. Nous ignorons toutefois si la polarisation des lymphocytes T CD4+ influence ce phénomène ou si les lymphocytes T CD8+ se comportent différemment. Il est ainsi possible que nous observions une différence entre les deux journées parce que l'expression des récepteurs de N1 varie au cours du temps, altérant la réponse cellulaire à N1.

Nous avons évalué l'impact de N1 sur la production de cytokines par les lymphocytes TH1, TH17 et CD8+. En utilisant la cytométrie de flux, nous avons écarté les cellules mortes et sélectionné les lymphocytes CD4+ ou CD8+. Pour la mesure des cytokines, nous avons sélectionné les populations en nous basant à la fois sur l'isotype et les populations cellulaires. Pour IFN- γ et TNF- α , nous pouvions distinguer des populations claires et avons basé la sélection en fonction de cette distinction. Pour GM-CSF, toutefois, nous ne pouvions aisément séparer les populations et avons donc placé le cadre de sélection en fonction de l'isotype. Nous n'avons pas observé de différences pour TH1, mais pour TH17, N1 réduisait de façon statistiquement significative la production d'IFN- γ et IL-17. Bien que le pourcentage moyen de cellules TH17 exprimant IL-17 était seulement d'environ 4%, ce chiffre était considérablement augmenté par rapport aux cellules TH1 dont moins de 1% exprimait IL-17. Cette différence nous suggère que le protocole de polarisation pour les lymphocytes TH17 a bel et bien fonctionné et que la différence observée suite au traitement avec N1 est réelle. Pour ce qui est des lymphocytes T CD8+, nous avons observé une diminution de la production d'IL-17 uniquement. Toutefois, le pourcentage moyen de cellules exprimant IL-17 est inférieur à 1%. De plus, les cellules positives ne forment pas une population distincte tel qu'il est le cas pour les lymphocytes TH17. Il n'est pas impossible que les lymphocytes T CD8+ activés n'expriment pas d'IL-17 et que les cellules sélectionnées soient faussement positives. Cela implique qu'il est possible que le

groupe contrôle ne se distingue que fortuitement du groupe N1 et que la différence observée ne soit pas réelle. Pour les lymphocytes T CD8+, nous avons également évalué l'expression des molécules granzyme B et perforine. Nous n'avons pas observé de différence dans l'expression de granzyme B, mais nous avons observé une diminution de l'expression de perforine dans le groupe traité par N1. Les populations positives ont été ici sélectionnées uniquement en fonction de l'isotype.

Nous avons évalué l'impact de N1 sur l'expression de molécules d'adhérence par les lymphocytes TH1, TH17 et CD8+. En utilisant la cytométrie de flux, les cellules mortes ont été écartées et les lymphocytes CD4+ ou CD8+ ont été sélectionnés. Puisqu'aucune population n'émergeait de façon distincte, nous avons sélectionné les cellules uniquement en fonction de l'isotype. Dans tous les cas, nous n'avons pas observé de différence dans l'expression des molécules d'adhérence entre les groupes contrôle et N1.

Une autre limite significative de notre modèle *in vitro* est l'ampleur de l'activation lymphocytaire qui y est provoquée. En effet, la co-stimulation par les anticorps anti-CD3 et anti-CD28 induit une activation particulièrement forte [300]. Ce type d'activation artificielle diffère grandement de l'activation physiologique induite par les APC *in vivo*. Plutôt que d'activer fortement les lymphocytes, il est possible que les APC induisent plutôt une tolérance des lymphocytes contre les antigènes présentés [301]. Les APC peuvent induire chez les lymphocytes un état d'anergie, c'est-à-dire un état d'inactivité dans lequel les lymphocytes ne répondent plus aux stimuli externes [302, 303]. Lorsqu'une APC présente un antigène à un lymphocyte T en l'absence du signal de co-stimulation résultant de l'interaction entre CD80/CD86 et CD28, le lymphocyte devient anergique [302, 304, 305]. Les APC peuvent également induire un état d'anergie en transmettant un signal inhibiteur directement au lymphocyte. Cela peut se faire en présentant CD80 et CD86 au récepteur CTLA-4, ou encore en présentant PD-L1 et PD-L2 au récepteur PD-1 sur les lymphocytes T [306-308]. De plus, les APC peuvent induire l'apoptose des lymphocytes T en liant, entre autres, le récepteur Fas des lymphocytes [309]. Les APC peuvent également favoriser le développement de Treg en exprimant diverses molécules de surface et en sécrétant diverses

cytokines, incluant IL-10 et TGF- β [310]. Étant donné le rôle anti-inflammatoire de N1 et sa production par les APC, il est possible que N1 contribue au développement de l'anergie et de la tolérance périphérique. Si une telle influence existe, il est improbable qu'elle soit perceptible dans notre modèle *in vitro* du fait de l'ampleur de l'activation lymphocytaire. En effet, il a été démontré que l'activation de lymphocytes T CD4+ *in vitro* par une combinaison d'anticorps anti-CD3 attachés à la plaque et d'anticorps anti-CD28 solubles augmente significativement la prolifération des lymphocytes et leur production de cytokines mais abolit la capacité des Treg à inhiber l'activation lymphocytaire en co-culture [311]. Une diminution de la concentration d'anticorps anti-CD3 attachés à la plaque, leur utilisation en forme soluble ou le retrait d'anticorps anti-CD28 restaurent la capacité d'inhibition des Treg tout en permettant l'activation des lymphocytes T cultivés séparément [311]. De plus, plusieurs expériences plus récentes évaluant la capacité d'inhibition des Treg utilisent avec succès des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 pour effectuer l'activation lymphocytaire [312-314]. Des expériences ultérieures pourraient évaluer l'impact de N1 sur l'induction de la tolérance lymphocytaire en diminuant les concentrations d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28, en utilisant un anticorps anti-CD3 soluble ou en remplaçant les anticorps par des billes recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28.

Le troisième objectif du projet était d'étudier l'importance de la production de N1 par les APC dans la neuro-inflammation. Les souris EAE ont été sacrifiées en fonction du stade clinique de la maladie et non en fonction d'un jour particulier suite à leur immunisation. Ceci est avantageux, puisque l'évolution de la maladie évolue à des rythmes différents entre les différents animaux. Cette façon de procéder nous assure que les trouvailles histologiques corréleront au stade clinique de la maladie et non à une période de temps arbitrairement déterminée. Le cerveau et la moelle épinière furent congelés et coupés en sections qui ont été marquées pour N1 ainsi que pour un marqueur cellulaire : CD11c pour les DC ou Iba-1 pour les macrophages et la microglie. Les sections marquées furent analysées par microscopie confocale.

Pour les DC, notre signal pour CD11c était très clair et nous permettait de bien identifier les DC. Nous n'avons toutefois pas pu observer de co-marquage pour CD11c et N1. Le signal pour N1 apparaît très faible puisque la sensibilité des capteurs est ajustée en fonction du signal maximal observé dans l'échantillon. Nous pouvions observer un signal de haute intensité pour N1 au niveau de plusieurs neurones du cortex cérébral, ce qui nous forçait à ajuster les capteurs à la baisse. Toutefois, nous ne croyons pas que cela affecte la validité de nos résultats. D'autres images ont été prises où la sensibilité des capteurs était passablement augmentée. Même si nous étions en mesure d'observer un marquage très intense pour N1 dans les neurones environnants, nous ne voyions toujours pas de co-marquage avec CD11c. Ainsi, l'absence de co-marquage ne peut être attribuée à une simple erreur de calibrage.

Pour les macrophages et la microglie, nous avons fait des observations similaires. Il n'y avait pas de co-marquage pour N1 et Iba-1, même en modifiant la sensibilité du capteur pour N1. Toutefois, nous avons noté du signal non spécifique diffus émanant de la matière blanche de la moelle épinière pour Iba-1. Ce signal disparaissait complètement sur les contrôles négatifs. Ce signal non spécifique a rendu l'identification des macrophages dans la moelle épinière plus difficile.

5.2 Implications Scientifiques des Résultats

Nos résultats démontrent que N1 est exprimée par les DC et que cette expression est grandement augmentée lors de la maturation. De plus, N1 est exprimée par les macrophages M1 mais pas par les macrophages M2. Le présent ouvrage est le premier à étudier l'expression de N1 par les DC. Bien que l'expression de N1 par les macrophages ait déjà été démontrée, incluant dans les lésions de SEP [250, 270], notre ouvrage est le premier à démontrer que N1 est exprimée par les macrophages de type M1 spécifiquement.

Cette expression semble à première vue constituer une contradiction. Les DC deviennent matures dans un contexte pro-inflammatoire et les macrophages M1 constituent le sous-type pro-inflammatoire de macrophage. Pourtant, N1 a démontré à plusieurs reprises ses propriétés anti-inflammatoires avec l'aide de

plusieurs modèles animaux [273, 282, 283, 285]. Il est possible que la production de N1 par les APC pro-inflammatoires constitue un phénomène de contre-régulation, c'est-à-dire un médiateur produit dans un contexte inflammatoire dont l'utilité est de contenir l'inflammation et assurer une régulation plus précise de la réponse inflammatoire. Ce rôle de N1 a déjà été observé dans plusieurs contextes. Une étude démontre que N1 est produite par les cellules épithéliales de la muqueuse intestinale dans un contexte inflammatoire et a pour effet d'atténuer l'infiltration leucocytaire [284]. Une autre étude démontre que N1 est produite par les cellules endothéliales de la BHE, son expression est augmentée par l'inflammation et elle agit de manière autocrine afin d'exercer un effet anti-inflammatoire sur la BHE [287]. Un phénomène semblable a déjà été observé chez les macrophages. En effet, les macrophages peuvent produire N1 afin d'influencer leur propre fonction de manière autocrine [270]. De plus, N1 peut induire le phénotype M2 chez ces derniers [273, 274]. Il est possible que les mDC et macrophages M1 produisent N1 afin de limiter leur propre phénotype pro-inflammatoire. La production de N1 par les APC pourrait également exercer un effet anti-inflammatoire en agissant directement sur la BHE. En effet, dans les lésions de SEP, les DC et les macrophages s'accumulent dans l'espace périvasculaire [158, 174]. Il a été démontré que N1 a un effet anti-inflammatoire sur la BHE et diminue sa perméabilité [287]. Il est possible que la N1 sécrétée par les APC dans l'espace périvasculaire ait une influence directe sur les cellules endothéliales adjacentes.

Il n'est toutefois pas impossible que cette production de N1 par les mDC et macrophages M1 ait un effet pro-inflammatoire. Bien que la majorité des études suggèrent que N1 a un rôle anti-inflammatoire, certaines affirment le contraire [280, 315]. Une étude suggère que N1 favorise la migration des lymphocytes T ainsi que l'infiltration tissulaire de ces derniers [276]. Les APC dans l'espace périvasculaire peuvent peut-être attirer les lymphocytes T par la production de N1. Il doit toutefois être noté que N1 inhibe la production des chimiokines CCL2 et CXCL8 par les cellules endothéliales de la BHE [287]. L'effet net de la production

de N1 par les APC périvasculaires sur la migration des lymphocytes à travers la BHE est inconnu.

En plus de produire N1, les mDC pourraient contribuer à la production de cN1. En effet, lorsqu'elles sont exposées à des stimuli inflammatoires, les DC expriment l'enzyme matrice métalloprotéase-9 (MMP-9) [316]. Il a été démontré que l'enzyme MMP-9 est responsable du clivage de N1 en sa forme tronquée [288]. Une étude suggère que N1 et cN1 ont des effets opposés : N1 diminue la perméabilité des capillaires rétiniens alors que cN1 l'augmente [288]. Il est possible que, dans un contexte inflammatoire, les DC clivent la N1 qu'ils sécrètent, résultant en une influence contraire à celle de la protéine N1 intacte.

Nos résultats démontrent que N1 augmente la prolifération des lymphocytes TH1, TH17 et CD8+. Le présent ouvrage est le premier à évaluer l'impact de N1 sur la prolifération lymphocytaire et révèle potentiellement un mécanisme important impliqué dans l'activation des lymphocytes. Lorsque les DC rencontrent un antigène dans un contexte inflammatoire, ces derniers mûrent et présentent l'antigène sur une molécule du CMH. Lors de la maturation, les DC augmentent leur expression de N1 qui est sécrétée dans l'espace environnant. Il a été démontré que N1 a un effet chimiocinétiq ue sur les lymphocytes T CD4+ et favorise leur migration [276]. Ainsi, la N1 produite par les mDC pourrait attirer les lymphocytes T et les guider vers les cellules présentant un antigène. Lors de la présentation antigénique, les DC expriment des molécules de co-stimulation et des cytokines afin d'activer les lymphocytes. Il est possible que la N1 produite par les mDC contribue à cette activation en favorisant la prolifération lymphocytaire.

Nos résultats démontrent que N1 diminue la production d'IFN- γ et d'IL-17 par les lymphocytes TH17 spécifiquement mais n'affecte pas la production de cytokines des lymphocytes TH1. Il a déjà été démontré chez la souris que N1 inhibe la production de cytokines par les lymphocytes T CD4+ activés [277]. Le présent ouvrage est toutefois le premier à démontrer un phénomène similaire chez l'humain, et il est le premier à distinguer les sous-types TH1 et TH17 dans ce contexte. Lorsque les lymphocytes entrent en contact avec les APC durant la présentation antigénique, que ce soit lors de l'activation initiale dans les ganglions

lymphatiques ou lors de la réactivation dans les tissus, la N1 produite par les APC pourrait inhiber la production de cytokines par les lymphocytes TH17 sans affecter les lymphocytes TH1. En préservant les lymphocytes TH1, N1 pourrait favoriser la réponse de type TH1 par rapport à la réponse de type TH17. Cela est particulièrement intéressant puisque les lymphocytes TH17 ont un rôle prédominant dans le développement de la SEP [165, 224-227, 232]. Il a été démontré que N1 est exprimé par des macrophages dans les lésions de SEP, et que les macrophages dans l'espace périvasculaire sont en étroite relation avec les lymphocytes T [174, 250]. Il est possible que N1 ait un rôle protecteur dans la SEP en inhibant la production de cytokines par les lymphocytes TH17, et ce, autant dans la périphérie que dans le SNC.

Nous avons démontré que N1 augmente la prolifération de tous les types de lymphocytes que nous avons étudiés. Toutefois, N1 inhibe la production de cytokines par les lymphocytes TH17 uniquement. Il est possible que cette apparente contradiction dans la spécificité de N1 soit expliquée par l'expression des récepteurs de N1 par les différents sous-types lymphocytaires. Il a été démontré que les lymphocytes CD4+ activés expriment néogénine ainsi que UNC5A et UNC5B dans une moindre mesure [276]. L'influence de la polarisation sur l'expression des récepteurs de N1 par les lymphocytes CD4+ est inconnue. Il est possible que l'impact de N1 sur la prolifération soit médié par un récepteur qui est exprimé par tous les lymphocytes, alors que l'impact de N1 sur la production de cytokines soit médié par un récepteur dont l'expression est augmentée lors de la polarisation TH17.

Nous avons démontré que N1 diminue l'expression de perforine par les lymphocytes T CD8+ activés. Certaines études suggèrent que l'activité cytotoxique des lymphocytes T CD8+ contribue à la pathogénèse de la SEP. Dans les lésions de SEP, on retrouve des lymphocytes T CD8+ à proximité d'oligodendrocytes et d'axones démyélinisés [244]. De plus, les granules cytotoxiques de ces lymphocytes sont polarisées en direction des neurones et la présence de lymphocytes cytotoxiques corrèle avec le degré de dommages axonaux [244, 245]. Il est possible que la N1 produite par les APC diminue la

production de perforine par les lymphocytes T CD8+ dans les lésions, diminue leur activité cytotoxique et exerce ainsi un rôle protecteur en SEP.

Le troisième objectif de notre projet était d'étudier l'importance de la production de N1 par les APC dans la neuro-inflammation. Nos résultats suggèrent que N1 n'est exprimée ni par les DC, ni par les macrophages ou la microglie dans le SNC des souris en EAE. Le présent ouvrage est le premier à s'intéresser à la production de N1 par les DC ou les macrophages en EAE. L'influence de N1 dans le développement de l'EAE avait toutefois déjà été étudiée. L'injection de N1 recombinante avant l'immunisation et le début des symptômes permet de diminuer le score clinique de la maladie, réduire l'infiltration leucocytaire, diminuer la perméabilité de la BHE et diminuer l'extravasation de protéines sériques dans le SNC [287]. Il est probable que l'effet protecteur de N1 sur la BHE contribue de manière significative à ce résultat. Même si N1 n'est pas produite par les APC en EAE, on ne peut écarter la possibilité que N1 agisse également sur les lymphocytes T dans ce contexte. Il a été démontré *in vitro* que N1 inhibe la production de cytokines par les lymphocytes T CD4+ activés [277]. Il est possible que l'injection de N1 ait également eu un impact sur le phénotype des lymphocytes, ce qui aurait pu contribuer à la réduction du score clinique. En somme, l'absence d'expression de N1 par les APC en EAE ne suffit pas à exclure la possibilité que N1 ait une influence sur la réponse lymphocytaire en EAE.

5.3 Implications Thérapeutiques

Nous avons démontré que N1 est produite par les mDC et macrophages de type M1. Nous avons également démontré que N1 augmente la prolifération des lymphocytes, diminue la production de cytokines des lymphocytes TH17 et diminue la production de perforine des lymphocytes T CD8+. Nos résultats suggèrent que l'axe N1 est impliqué dans la régulation de la réponse lymphocytaire par les APC. De plus, il a été démontré que N1 a un effet anti-inflammatoire sur la BHE et diminue sa perméabilité, qu'elle est exprimée par les macrophages dans les lésions de SEP et qu'elle permet d'atténuer le développement de l'EAE [250, 287]. L'importante implication de N1 à diverses

étapes clés du développement de la neuro-inflammation fait de l'axe N1 une cible thérapeutique prometteuse pour la SEP.

L'option thérapeutique la plus simple impliquant l'axe N1 est sans doute l'administration de la protéine N1 recombinante. Cette option présente toutefois deux lacunes majeures. Premièrement, N1 peut avoir des rôles pro-inflammatoires ou anti-inflammatoires dépendamment du contexte. D'une part, N1 diminue la production de cytokines par les lymphocytes TH17, diminue la production de perforine par les lymphocytes T CD8+, induit un phénotype anti-inflammatoire chez les macrophages et diminue la perméabilité de la BHE [274, 287]. D'autre part, N1 augmente la prolifération des lymphocytes T, favorise la rétention des macrophages dans les tissus inflammés, contribue à la migration lymphocytaire et favorise l'infiltration leucocytaires dans certains tissus [276, 281]. L'injection de protéine N1 recombinante pourrait donc avoir simultanément des effets pro-inflammatoires et anti-inflammatoires chez le patient, limitant sévèrement l'efficacité et l'innocuité de l'intervention. Deuxièmement, l'injection de N1 pourrait contribuer à la production de cN1. Les DC produisent l'enzyme MMP-9 dans un contexte inflammatoire et cette enzyme transforme N1 en cN1 [288, 316]. L'ajout de N1 exogène fournirait un substrat supplémentaire à cette réaction, favorisant la production de cN1. Cette dernière agirait alors comme antagoniste compétitif de N1 sur les récepteurs de la famille DCC/néogénine, limitant l'impact de N1 [250]. L'injection de N1 pourrait donc mener à sa propre inhibition en favorisant la production de cN1.

Une alternative plus prometteuse serait l'utilisation d'anticorps monoclonaux contre les récepteurs de N1. En effet, les divers récepteurs de N1 sont exprimés sur la plupart des leucocytes ainsi que sur les cellules endothéliales de la BHE. Dans le contexte de la guidance axonale, les récepteurs de la famille DCC/néogénine ont des effets opposés à ceux de la famille UNC5 [263]. Il est possible qu'un phénomène similaire soit observé chez les leucocytes et que certaines influences de N1 soient imputables à un récepteur en particulier. Par exemple, il a été démontré que l'effet de N1 sur la migration des lymphocytes T est médié par le récepteur néogénine [276]. Une meilleure caractérisation de

l'expression et de la fonction des récepteurs de N1 au niveau des leucocytes et de la BHE nous permettrait possiblement de déterminer les récepteurs responsables des effets pro-inflammatoires de N1. Le blocage spécifique de ces récepteurs permettrait d'inhiber les effets pro-inflammatoires de N1 tout en préservant ses effets anti-inflammatoires. Une approche semblable a déjà été tentée avec succès sur un modèle murin d'arthrite rhumatoïde chez qui l'injection d'un anticorps monoclonal contre UNC5B a pour effet de diminuer l'inflammation articulaire [285].

L'axe N1 est déjà activement étudié en tant que cible thérapeutique pour d'autres maladies que la SEP, particulièrement le cancer. Plusieurs études suggèrent que l'axe N1 est impliqué dans la pathophysiologie du cancer. En effet, certains récepteurs de N1, comme DCC, sont des récepteurs à dépendance qui exercent une activité particulière en l'absence de leur ligand [317]. Lorsque détaché de N1, le récepteur DCC a un effet pro-apoptotique et anti-oncogénique [318]. En accord avec ce fait, il a été observé qu'une délétion du récepteur DCC contribue au développement de plusieurs cancers [319, 320]. Lorsque N1 lie DCC sur les cellules tumorales, l'effet pro-apoptotique de ce récepteur est inhibé et la survie cellulaire est facilitée, conférant à N1 un effet oncogénique [318]. Il a été démontré que N1 est surexprimé par les cellules tumorales des cancers de l'ovaire, du poumon, du sein et du pancréas, les gliomes et certains lymphomes non-hodgkiniens [321-326]. Cette expression de N1 n'est probablement pas bénigne, puisque les tumeurs exprimant des niveaux plus élevés de N1 sont associées à un pronostic clinique défavorable dans plusieurs cancers [323, 324, 327, 328]. Il a été également démontré que N1 et DCC sont impliqués dans l'invasion cellulaire et le développement de métastases [323, 329-332].

Cette implication manifeste de l'axe N1 dans le développement du cancer a mené plusieurs chercheurs à étudier son application clinique, souvent avec succès. D'une part, N1 constitue un biomarqueur potentiel pour plusieurs cancers. Certaines études suggèrent que le taux sérique de N1 est plus élevé chez les patients atteints de cancer du poumon, de l'estomac, du sein, du rein, de la prostate et du foie ainsi que de méningiomes, glioblastomes et adénomes hypophysaires comparativement aux contrôles [328, 333, 334]. De plus, dans le

cas des cancers du poumon et de l'estomac, le taux sérique de N1 diminue à la suite de l'administration du traitement de chimiothérapie [333, 334]. D'autre part, plusieurs études pré-cliniques suggèrent que l'inhibition de N1 peut avoir un rôle thérapeutique. Des études *in vitro* démontrent que la suppression de N1 diminue la prolifération, la survie et l'infiltration de cellules tumorales dans plusieurs types de cancer [326, 327, 331, 332]. Ces résultats sont corroborés par des études *in vivo*, qui démontrent que l'inhibition de N1 réduit la croissance tumorale et le développement de métastases [325, 326, 331]. D'autres études démontrent que plusieurs traitements de chimiothérapie ont pour effet d'induire la production de N1 par certaines cellules tumorales et que l'inhibition de N1 augmente l'efficacité de la chimiothérapie sur ces cellules [335, 336]. Suite à la publication de toutes ces études, un essai clinique de phase I portant sur le traitement de tumeurs solides avancées par un anticorps monoclonal humanisé visant à neutraliser N1 a été récemment débuté [337]. Ainsi, l'axe N1 constitue une cible thérapeutique prometteuse dans le traitement du cancer. Des recherches supplémentaires sont nécessaires afin de terminer si un tel potentiel existe quant au traitement de la SEP ou d'autres maladies auto-immunes.

5.4 Orientation Future

Afin de mieux comprendre les résultats obtenus et d'identifier une cible thérapeutique plus précise pour la SEP, il pourrait être utile de caractériser davantage l'expression et la fonction des récepteurs de N1 par les lymphocytes. Les lymphocytes TH1, TH17 et CD8+ seraient mis en culture et recueillis à différents jours. Leur expression de DCC, néogénine, et UNC5A à D serait mesurée par qPCR. Les expériences *in vitro* évaluant la prolifération cellulaire et la production de cytokines seraient répétées en ajoutant un anticorps monoclonal contre les récepteurs exprimés. Cette méthode permettrait d'isoler les récepteurs responsables de chacun des effets de N1 ayant été observés.

Les résultats présentés sont basés sur des modèles *in vitro* qui diffèrent grandement des processus physiologiques se déroulant *in vivo*. Afin de s'assurer que la N1 produite par les APC est capable d'induire les mêmes résultats que la

N1 recombinante ajoutée aux lymphocytes T en culture, des expériences utilisant un modèle de coculture devraient être menées à terme. Les lymphocytes TH1, TH17 et CD8+ seraient mis en culture avec des mDC ou des macrophages de type M1. La moitié des cellules pourrait alors être traitée avec un anticorps bloquant contre N1 et l'autre moitié serait utilisée comme groupe de contrôle. Nous pourrions ainsi observer si la N1 produite par les APC joue réellement un rôle important dans l'activation lymphocytaire.

Nous avons démontré que N1 n'est pas exprimée par les APC dans le SNC en EAE. Toutefois, cela ne veut pas dire que ce n'est pas le cas en SEP. Il a déjà été démontré que N1 est exprimée par les macrophages dans les lésions de SEP [250]. L'expression de N1 par les DC dans les lésions de SEP n'a toutefois jamais été étudiée. Un marquage par immunofluorescence pour N1 et des marqueurs de DC devrait être effectué sur des sections de lésions de SEP. Cela nous permettrait d'en apprendre davantage sur le rôle de l'axe N1 dans la pathogénèse de la SEP.

Expression de Nétrine-1	Effets de Nétrine-1	Rôle de Nétrine-1 dans l'EAE
Monocytes - 0	Lymphocytes CD4+ TH1 - Prolifération : ↑ - Cytokines : - - CAMs : -	Cerveau - DCs : 0 - Macrophages : 0
Cellules Dendritiques - iDCs : + - mDCs : +++++	Lymphocytes CD4+ TH17 - Prolifération : ↑ - Cytokines: - ↓IFN-γ - ↓IL-17 - CAMs : -	Moelle épinière - DCs : 0 - Macrophages : 0
Macrophages - M1 : +++++ - M2 : 0	Lymphocytes CD8+ - Prolifération : ↑ - Cytokines : ↓ IL-17? - Granzyme B : - - Perforine : ↓ - CAMs : -	

Figure 34. Résumé des résultats.

6. Conclusion

Nos résultats démontrent que N1 est exprimée par les mDC et les macrophages de type M1. Ils démontrent également que N1 favorise la prolifération lymphocytaire. De plus, N1 diminue sélectivement la production de cytokines par les lymphocytes TH17 et diminue la production de perforine par les lymphocytes T CD8+. Ils démontrent que N1 n'a pas d'influence sur l'expression de molécules d'adhérence par les lymphocytes et que N1 n'est pas exprimée par les APC dans le SNC des souris en EAE. Le présent ouvrage est le premier à s'intéresser à la production de N1 par les DC et à déterminer le phénotype des macrophages exprimant N1. Il est le premier à évaluer l'impact de N1 sur la prolifération lymphocytaire, la production de cytokines par les lymphocytes TH1 et TH17 et l'expression de molécules d'adhérence par les lymphocytes. Il est également le premier à s'intéresser à l'expression de N1 par les APC en EAE.

Nos résultats suggèrent que l'axe N1 constitue un mécanisme impliqué dans la régulation de l'activation lymphocytaire par les APC. L'omniprésence de ces leucocytes dans les lésions de SEP et leur importance indéniable dans sa pathogénèse placent l'axe N1 au centre du développement de la maladie. Nos résultats évoquent la possibilité d'employer l'axe N1 comme cible thérapeutique pour la SEP ou pour d'autres maladies inflammatoires. Une meilleure caractérisation de l'expression des récepteurs de N1 et de leurs fonctions permettrait d'approfondir notre compréhension de l'influence de l'axe N1 sur la réponse inflammatoire et de désigner certains récepteurs comme étant des cibles thérapeutiques prometteuses pour la SEP.

Références

1. Davies, L.C., et al., *Tissue-resident macrophages*. Nat Immunol, 2013. **14**(10): p. 986-95.
2. Hansen, J.D., L.N. Vojtech, and K.J. Laing, *Sensing disease and danger: a survey of vertebrate PRRs and their origins*. Dev Comp Immunol, 2011. **35**(9): p. 886-97.
3. Newton, K. and V.M. Dixit, *Signaling in innate immunity and inflammation*. Cold Spring Harb Perspect Biol, 2012. **4**(3).
4. Takeuchi, O. and S. Akira, *Pattern recognition receptors and inflammation*. Cell, 2010. **140**(6): p. 805-20.
5. Larrick, J.W. and S.L. Kunkel, *The role of tumor necrosis factor and interleukin 1 in the immunoinflammatory response*. Pharm Res, 1988. **5**(3): p. 129-39.
6. Pober, J.S., et al., *Two distinct monokines, interleukin 1 and tumor necrosis factor, each independently induce biosynthesis and transient expression of the same antigen on the surface of cultured human vascular endothelial cells*. J Immunol, 1986. **136**(5): p. 1680-7.
7. Bevilacqua, M.P., et al., *Interleukin 1 acts on cultured human vascular endothelium to increase the adhesion of polymorphonuclear leukocytes, monocytes, and related leukocyte cell lines*. J Clin Invest, 1985. **76**(5): p. 2003-11.
8. Bischoff, J. and C. Brasel, *Regulation of P-selectin by tumor necrosis factor-alpha*. Biochem Biophys Res Commun, 1995. **210**(1): p. 174-80.
9. Springer, T.A., *Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm*. Cell, 1994. **76**(2): p. 301-14.
10. Ley, K., et al., *Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated*. Nat Rev Immunol, 2007. **7**(9): p. 678-89.
11. Nourshargh, S., P.L. Hordijk, and M. Sixt, *Breaching multiple barriers: leukocyte motility through venular walls and the interstitium*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2010. **11**(5): p. 366-78.
12. Chistiakov, D.A., Y.V. Bobryshev, and A.N. Orekhov, *Neutrophil's weapons in atherosclerosis*. Exp Mol Pathol, 2015. **99**(3): p. 663-71.
13. Mayadas, T.N., X. Cullere, and C.A. Lowell, *The multifaceted functions of neutrophils*. Annu Rev Pathol, 2014. **9**: p. 181-218.
14. Selders, G.S., et al., *An overview of the role of neutrophils in innate immunity, inflammation and host-biomaterial integration*. Regen Biomater, 2017. **4**(1): p. 55-68.
15. Carvalho, L.O., et al., *The Neutrophil Nucleus and Its Role in Neutrophilic Function*. J Cell Biochem, 2015. **116**(9): p. 1831-6.
16. Jaillon, S., et al., *Neutrophils in innate and adaptive immunity*. Semin Immunopathol, 2013. **35**(4): p. 377-94.
17. Balderramas, H.A., et al., *Human neutrophils produce IL-12, IL-10, PGE2 and LTB4 in response to Paracoccidioides brasiliensis. Involvement of TLR2, mannose receptor and dectin-1*. Cytokine, 2014. **67**(1): p. 36-43.
18. Knob, C.D., et al., *Effects of budlein A on human neutrophils and lymphocytes*. J Appl Oral Sci, 2016. **24**(3): p. 271-7.
19. Magalhaes, L.M.D., et al., *Distinct Trypanosoma cruzi isolates induce activation and apoptosis of human neutrophils*. PLoS One, 2017. **12**(11): p. e0188083.
20. Bliss, S.K., B.A. Butcher, and E.Y. Denkers, *Rapid recruitment of neutrophils containing prestored IL-12 during microbial infection*. J Immunol, 2000. **165**(8): p. 4515-21.
21. Jimbo, S., et al., *Effect of Mycoplasma bovis on bovine neutrophils*. Vet Immunol Immunopathol, 2017. **188**: p. 27-33.

22. Tamassia, N., et al., *Human neutrophils activated via TLR8 promote Th17 polarization through IL-23*. *J Leukoc Biol*, 2019. **105**(6): p. 1155-1165.
23. Hu, S., et al., *IL-17 Production of Neutrophils Enhances Antibacteria Ability but Promotes Arthritis Development During Mycobacterium tuberculosis Infection*. *EBioMedicine*, 2017. **23**: p. 88-99.
24. Bennouna, S., et al., *Cross-talk in the innate immune system: neutrophils instruct recruitment and activation of dendritic cells during microbial infection*. *J Immunol*, 2003. **171**(11): p. 6052-8.
25. van Gisbergen, K.P., et al., *Neutrophils mediate immune modulation of dendritic cells through glycosylation-dependent interactions between Mac-1 and DC-SIGN*. *J Exp Med*, 2005. **201**(8): p. 1281-92.
26. Chertov, O., et al., *Identification of human neutrophil-derived cathepsin G and azurocidin/CAP37 as chemoattractants for mononuclear cells and neutrophils*. *J Exp Med*, 1997. **186**(5): p. 739-47.
27. Hussien, J., et al., *Neutrophil degranulation differentially modulates phenotype and function of bovine monocyte subsets*. *Innate Immun*, 2016. **22**(2): p. 124-37.
28. Ethuin, F., et al., *Human neutrophils produce interferon gamma upon stimulation by interleukin-12*. *Lab Invest*, 2004. **84**(10): p. 1363-71.
29. Shi, C. and E.G. Pamer, *Monocyte recruitment during infection and inflammation*. *Nat Rev Immunol*, 2011. **11**(11): p. 762-74.
30. Serbina, N.V., et al., *Monocyte-mediated defense against microbial pathogens*. *Annu Rev Immunol*, 2008. **26**: p. 421-52.
31. Erickson-Miller, C.L., J.K. Brennan, and C.N. Abboud, *Examination of survival, proliferation and cell surface antigen expression of human monocytes exposed to macrophage colony-stimulating factor (M-CSF)*. *Int J Cell Cloning*, 1990. **8**(5): p. 346-56.
32. Geissler, K., et al., *Effects of recombinant human colony stimulating factors (CSF) (granulocyte-macrophage CSF, granulocyte CSF, and CSF-1) on human monocyte/macrophage differentiation*. *J Immunol*, 1989. **143**(1): p. 140-6.
33. Gersuk, G., A. Hiraoka, and K.A. Marr, *Human monocytes differentiate into macrophages under the influence of human KPB-M15 conditioned medium*. *J Immunol Methods*, 2005. **299**(1-2): p. 99-106.
34. Mitani, H., et al., *Activity of interleukin 6 in the differentiation of monocytes to macrophages and dendritic cells*. *Br J Haematol*, 2000. **109**(2): p. 288-95.
35. Mahdavian Delavary, B., et al., *Macrophages in skin injury and repair*. *Immunobiology*, 2011. **216**(7): p. 753-62.
36. Hamidzadeh, K., et al., *Macrophages and the Recovery from Acute and Chronic Inflammation*. *Annu Rev Physiol*, 2017. **79**: p. 567-592.
37. Steinman, R.M., *The dendritic cell system and its role in immunogenicity*. *Annu Rev Immunol*, 1991. **9**: p. 271-96.
38. Shortman, K. and Y.J. Liu, *Mouse and human dendritic cell subtypes*. *Nat Rev Immunol*, 2002. **2**(3): p. 151-61.
39. Banchereau, J., et al., *Immunobiology of dendritic cells*. *Annu Rev Immunol*, 2000. **18**: p. 767-811.
40. Mellman, I. and R.M. Steinman, *Dendritic cells: specialized and regulated antigen processing machines*. *Cell*, 2001. **106**(3): p. 255-8.

41. Saeki, H., et al., *Cutting edge: secondary lymphoid-tissue chemokine (SLC) and CC chemokine receptor 7 (CCR7) participate in the emigration pathway of mature dendritic cells from the skin to regional lymph nodes.* J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2472-5.
42. Miller, M.J., et al., *Imaging the single cell dynamics of CD4+ T cell activation by dendritic cells in lymph nodes.* J Exp Med, 2004. **200**(7): p. 847-56.
43. Embgenbroich, M. and S. Burgdorf, *Current Concepts of Antigen Cross-Presentation.* Front Immunol, 2018. **9**: p. 1643.
44. Hart, D.N., *Dendritic cells: unique leukocyte populations which control the primary immune response.* Blood, 1997. **90**(9): p. 3245-87.
45. Collin, M. and F. Ginhoux, *Human dendritic cells.* Semin Cell Dev Biol, 2018.
46. Collin, M. and V. Bigley, *Human dendritic cell subsets: an update.* Immunology, 2018. **154**(1): p. 3-20.
47. Zhang, J.G., et al., *The dendritic cell receptor Clec9A binds damaged cells via exposed actin filaments.* Immunity, 2012. **36**(4): p. 646-57.
48. Schreibelt, G., et al., *The C-type lectin receptor CLEC9A mediates antigen uptake and (cross-)presentation by human blood BDCA3+ myeloid dendritic cells.* Blood, 2012. **119**(10): p. 2284-92.
49. Liu, S., et al., *Phosphorylation of innate immune adaptor proteins MAVS, STING, and TRIF induces IRF3 activation.* Science, 2015. **347**(6227): p. aaa2630.
50. Nizzoli, G., et al., *Human CD1c+ dendritic cells secrete high levels of IL-12 and potently prime cytotoxic T-cell responses.* Blood, 2013. **122**(6): p. 932-42.
51. Lauterbach, H., et al., *Mouse CD8alpha+ DCs and human BDCA3+ DCs are major producers of IFN-lambda in response to poly IC.* J Exp Med, 2010. **207**(12): p. 2703-17.
52. Collin, M., N. McGovern, and M. Haniffa, *Human dendritic cell subsets.* Immunology, 2013. **140**(1): p. 22-30.
53. Haniffa, M., et al., *Human tissues contain CD141hi cross-presenting dendritic cells with functional homology to mouse CD103+ nonlymphoid dendritic cells.* Immunity, 2012. **37**(1): p. 60-73.
54. Watchmaker, P.B., et al., *Comparative transcriptional and functional profiling defines conserved programs of intestinal DC differentiation in humans and mice.* Nat Immunol, 2014. **15**(1): p. 98-108.
55. Kelly, A., et al., *CD141(+) myeloid dendritic cells are enriched in healthy human liver.* J Hepatol, 2014. **60**(1): p. 135-42.
56. Bigley, V., et al., *Langerin-expressing dendritic cells in human tissues are related to CD1c+ dendritic cells and distinct from Langerhans cells and CD141high XCR1+ dendritic cells.* J Leukoc Biol, 2015. **97**(4): p. 627-34.
57. van der Aar, A.M., et al., *Loss of TLR2, TLR4, and TLR5 on Langerhans cells abolishes bacterial recognition.* J Immunol, 2007. **178**(4): p. 1986-90.
58. Lundberg, K., et al., *Transcriptional profiling of human dendritic cell populations and models--unique profiles of in vitro dendritic cells and implications on functionality and applicability.* PLoS One, 2013. **8**(1): p. e52875.
59. Van Rhijn, I., D. Ly, and D.B. Moody, *CD1a, CD1b, and CD1c in immunity against mycobacteria.* Adv Exp Med Biol, 2013. **783**: p. 181-97.
60. Nizzoli, G., et al., *IL-10 promotes homeostatic proliferation of human CD8(+) memory T cells and, when produced by CD1c(+) DCs, shapes naive CD8(+) T-cell priming.* Eur J Immunol, 2016. **46**(7): p. 1622-32.

61. Segura, E., M. Durand, and S. Amigorena, *Similar antigen cross-presentation capacity and phagocytic functions in all freshly isolated human lymphoid organ-resident dendritic cells*. J Exp Med, 2013. **210**(5): p. 1035-47.
62. Reizis, B., et al., *Plasmacytoid dendritic cells: recent progress and open questions*. Annu Rev Immunol, 2011. **29**: p. 163-83.
63. Perussia, B., V. Fanning, and G. Trinchieri, *A leukocyte subset bearing HLA-DR antigens is responsible for in vitro alpha interferon production in response to viruses*. Nat Immun Cell Growth Regul, 1985. **4**(3): p. 120-37.
64. Bao, M. and Y.J. Liu, *Regulation of TLR7/9 signaling in plasmacytoid dendritic cells*. Protein Cell, 2013. **4**(1): p. 40-52.
65. Tel, J., et al., *Human plasmacytoid dendritic cells efficiently cross-present exogenous Ags to CD8+ T cells despite lower Ag uptake than myeloid dendritic cell subsets*. Blood, 2013. **121**(3): p. 459-67.
66. Langlet, C., et al., *CD64 expression distinguishes monocyte-derived and conventional dendritic cells and reveals their distinct role during intramuscular immunization*. J Immunol, 2012. **188**(4): p. 1751-60.
67. Romani, N., et al., *Proliferating dendritic cell progenitors in human blood*. J Exp Med, 1994. **180**(1): p. 83-93.
68. Guillems, M. and L. van de Laar, *A Hitchhiker's Guide to Myeloid Cell Subsets: Practical Implementation of a Novel Mononuclear Phagocyte Classification System*. Front Immunol, 2015. **6**: p. 406.
69. Segura, E., et al., *Human inflammatory dendritic cells induce Th17 cell differentiation*. Immunity, 2013. **38**(2): p. 336-48.
70. Underhill, D.M., et al., *Dynamic interactions of macrophages with T cells during antigen presentation*. J Exp Med, 1999. **190**(12): p. 1909-14.
71. Mantegazza, A.R., et al., *Presentation of phagocytosed antigens by MHC class I and II*. Traffic, 2013. **14**(2): p. 135-52.
72. McLachlan, J.B. and M.K. Jenkins, *Migration and accumulation of effector CD4+ T cells in nonlymphoid tissues*. Proc Am Thorac Soc, 2007. **4**(5): p. 439-42.
73. Ford, G.S., et al., *Regulation of CD154 (CD40 ligand) mRNA stability during T cell activation*. J Immunol, 1999. **162**(7): p. 4037-44.
74. Schoenborn, J.R. and C.B. Wilson, *Regulation of interferon-gamma during innate and adaptive immune responses*. Adv Immunol, 2007. **96**: p. 41-101.
75. Stout, R.D., et al., *Impaired T cell-mediated macrophage activation in CD40 ligand-deficient mice*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 8-11.
76. Bingaman, A.W., T.C. Pearson, and C.P. Larsen, *The role of CD40L in T cell-dependent nitric oxide production by murine macrophages*. Transpl Immunol, 2000. **8**(3): p. 195-202.
77. Ley, K., *The second touch hypothesis: T cell activation, homing and polarization*. F1000Res, 2014. **3**: p. 37.
78. Hume, D.A., *Macrophages as APC and the dendritic cell myth*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 5829-35.
79. Mills, C.D., *M1 and M2 Macrophages: Oracles of Health and Disease*. Crit Rev Immunol, 2012. **32**(6): p. 463-88.
80. Martinez, F.O. and S. Gordon, *The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment*. F1000Prime Rep, 2014. **6**: p. 13.
81. Hamilton, T.A., et al., *Myeloid colony-stimulating factors as regulators of macrophage polarization*. Front Immunol, 2014. **5**: p. 554.

82. Vodovotz, Y., et al., *Mechanisms of suppression of macrophage nitric oxide release by transforming growth factor beta*. J Exp Med, 1993. **178**(2): p. 605-13.
83. Mills, C.D., et al., *M-1/M-2 macrophages and the Th1/Th2 paradigm*. J Immunol, 2000. **164**(12): p. 6166-73.
84. Drake, J.R., et al., *Delivery of B cell receptor-internalized antigen to endosomes and class II vesicles*. J Exp Med, 1997. **186**(8): p. 1299-306.
85. Elgueta, R., et al., *Molecular mechanism and function of CD40/CD40L engagement in the immune system*. Immunol Rev, 2009. **229**(1): p. 152-72.
86. Rodriguez-Pinto, D., *B cells as antigen presenting cells*. Cell Immunol, 2005. **238**(2): p. 67-75.
87. Heneka, M.T., D.T. Golenbock, and E. Latz, *Innate immunity in Alzheimer's disease*. Nat Immunol, 2015. **16**(3): p. 229-36.
88. Perry, V.H., J.A. Nicoll, and C. Holmes, *Microglia in neurodegenerative disease*. Nat Rev Neurol, 2010. **6**(4): p. 193-201.
89. Wyss-Coray, T. and L. Mucke, *Inflammation in neurodegenerative disease--a double-edged sword*. Neuron, 2002. **35**(3): p. 419-32.
90. Schettlers, S.T.T., et al., *Neuroinflammation: Microglia and T Cells Get Ready to Tango*. Front Immunol, 2017. **8**: p. 1905.
91. Korn, T. and A. Kallies, *T cell responses in the central nervous system*. Nat Rev Immunol, 2017. **17**(3): p. 179-194.
92. Artyomov, M.N., et al., *CD4 and CD8 binding to MHC molecules primarily acts to enhance Lck delivery*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2010. **107**(39): p. 16916-21.
93. Weiss, A. and D.R. Littman, *Signal transduction by lymphocyte antigen receptors*. Cell, 1994. **76**(2): p. 263-74.
94. Miyahira, Y., et al., *Critical contribution of CD28-CD80/CD86 costimulatory pathway to protection from Trypanosoma cruzi infection*. Infect Immun, 2003. **71**(6): p. 3131-7.
95. Van Gool, S.W., et al., *CD80, CD86 and CD40 provide accessory signals in a multiple-step T-cell activation model*. Immunol Rev, 1996. **153**: p. 47-83.
96. Hsieh, C.S., et al., *Development of TH1 CD4+ T cells through IL-12 produced by Listeria-induced macrophages*. Science, 1993. **260**(5107): p. 547-9.
97. Lighvani, A.A., et al., *T-bet is rapidly induced by interferon-gamma in lymphoid and myeloid cells*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2001. **98**(26): p. 15137-42.
98. Murray, H.W., et al., *Human mononuclear phagocyte antiprotozoal mechanisms: oxygen-dependent vs oxygen-independent activity against intracellular Toxoplasma gondii*. J Immunol, 1985. **134**(3): p. 1982-8.
99. Gattinoni, L., et al., *Acquisition of full effector function in vitro paradoxically impairs the in vivo antitumor efficacy of adoptively transferred CD8+ T cells*. J Clin Invest, 2005. **115**(6): p. 1616-26.
100. Miller, C.M., et al., *Immunological interactions between 2 common pathogens, Th1-inducing protozoan Toxoplasma gondii and the Th2-inducing helminth Fasciola hepatica*. PLoS One, 2009. **4**(5): p. e5692.
101. Le Gros, G., et al., *Generation of interleukin 4 (IL-4)-producing cells in vivo and in vitro: IL-2 and IL-4 are required for in vitro generation of IL-4-producing cells*. J Exp Med, 1990. **172**(3): p. 921-9.
102. Zhu, J., *T helper 2 (Th2) cell differentiation, type 2 innate lymphoid cell (ILC2) development and regulation of interleukin-4 (IL-4) and IL-13 production*. Cytokine, 2015. **75**(1): p. 14-24.
103. Cote-Sierra, J., et al., *Interleukin 2 plays a central role in Th2 differentiation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(11): p. 3880-5.

104. Walker, J.A. and A.N.J. McKenzie, *TH2 cell development and function*. Nat Rev Immunol, 2018. **18**(2): p. 121-133.
105. Bettelli, E., et al., *Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 235-8.
106. Nurieva, R., et al., *Essential autocrine regulation by IL-21 in the generation of inflammatory T cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 480-3.
107. Korn, T., et al., *IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory T(H)17 cells*. Nature, 2007. **448**(7152): p. 484-487.
108. Mangan, P.R., et al., *Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage*. Nature, 2006. **441**(7090): p. 231-4.
109. Zhou, L., et al., *IL-6 programs T(H)-17 cell differentiation by promoting sequential engagement of the IL-21 and IL-23 pathways*. Nat Immunol, 2007. **8**(9): p. 967-74.
110. Stritesky, G.L., N. Yeh, and M.H. Kaplan, *IL-23 promotes maintenance but not commitment to the Th17 lineage*. J Immunol, 2008. **181**(9): p. 5948-55.
111. Moseley, T.A., et al., *Interleukin-17 family and IL-17 receptors*. Cytokine Growth Factor Rev, 2003. **14**(2): p. 155-74.
112. Leonard, W.J. and R. Spolski, *Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation*. Nat Rev Immunol, 2005. **5**(9): p. 688-98.
113. Aujla, S.J., et al., *IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia*. Nat Med, 2008. **14**(3): p. 275-81.
114. Curtis, M.M. and S.S. Way, *Interleukin-17 in host defence against bacterial, mycobacterial and fungal pathogens*. Immunology, 2009. **126**(2): p. 177-85.
115. Zheng, S.G., et al., *IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells*. J Immunol, 2007. **178**(4): p. 2018-27.
116. Collison, L.W., et al., *The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function*. Nature, 2007. **450**(7169): p. 566-9.
117. Levings, M.K., et al., *The role of IL-10 and TGF-beta in the differentiation and effector function of T regulatory cells*. Int Arch Allergy Immunol, 2002. **129**(4): p. 263-76.
118. Couper, K.N., D.G. Blount, and E.M. Riley, *IL-10: the master regulator of immunity to infection*. J Immunol, 2008. **180**(9): p. 5771-7.
119. Nolz, J.C., G.R. Starbeck-Miller, and J.T. Harty, *Naive, effector and memory CD8 T-cell trafficking: parallels and distinctions*. Immunotherapy, 2011. **3**(10): p. 1223-33.
120. Del Val, M., et al., *Generation of MHC class I ligands in the secretory and vesicular pathways*. Cell Mol Life Sci, 2011. **68**(9): p. 1543-52.
121. Thatte, J., et al., *LFA-1 is required for retention of effector CD8 T cells in mouse lungs*. Blood, 2003. **101**(12): p. 4916-22.
122. Radoja, S., A.B. Frey, and S. Vukmanovic, *T-cell receptor signaling events triggering granule exocytosis*. Crit Rev Immunol, 2006. **26**(3): p. 265-90.
123. Harari, A., et al., *Distinct profiles of cytotoxic granules in memory CD8 T cells correlate with function, differentiation stage, and antigen exposure*. J Virol, 2009. **83**(7): p. 2862-71.
124. Fan, Z. and Q. Zhang, *Molecular mechanisms of lymphocyte-mediated cytotoxicity*. Cell Mol Immunol, 2005. **2**(4): p. 259-64.
125. Spicer, B.A., et al., *Perforin-A key (shaped) weapon in the immunological arsenal*. Semin Cell Dev Biol, 2017. **72**: p. 117-123.
126. Kidd, V.J., J.M. Lahti, and T. Teitz, *Proteolytic regulation of apoptosis*. Semin Cell Dev Biol, 2000. **11**(3): p. 191-201.

127. Vukmanovic-Stejic, M., et al., *Specificity, restriction and effector mechanisms of immunoregulatory CD8 T cells*. Immunology, 2001. **102**(2): p. 115-22.
128. Beck, C.A., et al., *Regional variation of multiple sclerosis prevalence in Canada*. Mult Scler, 2005. **11**(5): p. 516-9.
129. Marrie, R.A., et al., *The rising prevalence and changing age distribution of multiple sclerosis in Manitoba*. Neurology, 2010. **74**(6): p. 465-71.
130. Kingwell, E., et al., *High incidence and increasing prevalence of multiple sclerosis in British Columbia, Canada: findings from over two decades (1991-2010)*. J Neurol, 2015. **262**(10): p. 2352-63.
131. Marrie, R.A., et al., *The incidence and prevalence of multiple sclerosis in Nova Scotia, Canada*. Can J Neurol Sci, 2013. **40**(6): p. 824-31.
132. Belbasis, L., et al., *Environmental risk factors and multiple sclerosis: an umbrella review of systematic reviews and meta-analyses*. Lancet Neurol, 2015. **14**(3): p. 263-73.
133. Simon, K.C., et al., *Risk factors for multiple sclerosis, neuromyelitis optica and transverse myelitis*. Mult Scler, 2015. **21**(6): p. 703-9.
134. Inglese, M., *Multiple sclerosis: new insights and trends*. AJNR Am J Neuroradiol, 2006. **27**(5): p. 954-7.
135. Mackenzie, I.S., et al., *Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the UK 1990-2010: a descriptive study in the General Practice Research Database*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2014. **85**(1): p. 76-84.
136. Pierrot-Deseilligny, C. and J.C. Souberbielle, *Vitamin D and multiple sclerosis: An update*. Mult Scler Relat Disord, 2017. **14**: p. 35-45.
137. Simpson, S., Jr., et al., *Latitude is significantly associated with the prevalence of multiple sclerosis: a meta-analysis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 2011. **82**(10): p. 1132-41.
138. Poppe, A.Y., C. Wolfson, and B. Zhu, *Prevalence of multiple sclerosis in Canada: a systematic review*. Can J Neurol Sci, 2008. **35**(5): p. 593-601.
139. Melcon, M.O., et al., *Argentine Patagonia: prevalence and clinical features of multiple sclerosis*. Mult Scler, 2008. **14**(5): p. 656-62.
140. Pearce, J.M., *Historical descriptions of multiple sclerosis*. Eur Neurol, 2005. **54**(1): p. 49-53.
141. Frohman, E.M., M.K. Racke, and C.S. Raine, *Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis*. N Engl J Med, 2006. **354**(9): p. 942-55.
142. Babbe, H., 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**(3): p. 393-404.
143. Esiri, M.M., *Multiple sclerosis: a quantitative and qualitative study of immunoglobulin-containing cells in the central nervous system*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1980. **6**(1): p. 9-21.
144. Hoftberger, R., et al., *Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions*. Brain Pathol, 2004. **14**(1): p. 43-50.
145. Popescu, B.F., I. Pirko, and C.F. Lucchinetti, *Pathology of multiple sclerosis: where do we stand?* Continuum (Minneapolis), 2013. **19**(4 Multiple Sclerosis): p. 901-21.
146. Wu, G.F. and E. Alvarez, *The immunopathophysiology of multiple sclerosis*. Neurol Clin, 2011. **29**(2): p. 257-78.
147. Prineas, J.W., et al., *Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis*. Ann Neurol, 2001. **50**(5): p. 646-57.
148. Trapp, B.D., et al., *Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis*. N Engl J Med, 1998. **338**(5): p. 278-85.

149. McMahon, E.J., et al., *Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis*. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 335-9.
150. Greter, M., et al., *Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis*. Nat Med, 2005. **11**(3): p. 328-34.
151. Mohammad, M.G., et al., *Immune cell trafficking from the brain maintains CNS immune tolerance*. J Clin Invest, 2014. **124**(3): p. 1228-41.
152. de Vos, A.F., et al., *Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs*. J Immunol, 2002. **169**(10): p. 5415-23.
153. Zhu, J. and W.E. Paul, *Heterogeneity and plasticity of T helper cells*. Cell Res, 2010. **20**(1): p. 4-12.
154. Bailey, S.L., et al., *CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE*. Nat Immunol, 2007. **8**(2): p. 172-80.
155. Kang, Z., et al., *Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis*. Immunity, 2010. **32**(3): p. 414-25.
156. Tompkins, S.M., et al., *De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 2002. **168**(8): p. 4173-83.
157. McRae, B.L., et al., *Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 1995. **182**(1): p. 75-85.
158. Serafini, B., et al., *Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells*. J Neuropathol Exp Neurol, 2006. **65**(2): p. 124-41.
159. Cudrici, C., et al., *Dendritic cells are abundant in non-lesional gray matter in multiple sclerosis*. Exp Mol Pathol, 2007. **83**(2): p. 198-206.
160. Huang, Y.M., et al., *Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines*. J Neuroimmunol, 1999. **99**(1): p. 82-90.
161. Pashenkov, M., et al., *Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid*. Brain, 2001. **124**(Pt 3): p. 480-92.
162. Vaknin-Dembinsky, A., et al., *Increased IL-23 secretion and altered chemokine production by dendritic cells upon CD46 activation in patients with multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 2008. **195**(1-2): p. 140-5.
163. Boven, L.A., et al., *Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions*. Clin Exp Immunol, 2000. **122**(2): p. 257-63.
164. Ifergan, I., et al., *The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells*. Brain, 2008. **131**(Pt 3): p. 785-99.
165. Li, Y., et al., *Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia*. Brain, 2007. **130**(Pt 2): p. 490-501.
166. Zozulya, A.L., et al., *Dendritic cell transmigration through brain microvessel endothelium is regulated by MIP-1alpha chemokine and matrix metalloproteinases*. J Immunol, 2007. **178**(1): p. 520-9.
167. Suter, T., et al., *Dendritic cells and differential usage of the MHC class II transactivator promoters in the central nervous system in experimental autoimmune encephalitis*. Eur J Immunol, 2000. **30**(3): p. 794-802.
168. Serafini, B., et al., *Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis*. Am J Pathol, 2000. **157**(6): p. 1991-2002.

169. Miller, S.D., et al., *Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis*. Ann N Y Acad Sci, 2007. **1103**: p. 179-91.
170. Kivisakk, P., et al., *Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis*. Ann Neurol, 2009. **65**(4): p. 457-69.
171. Whartenby, K.A., et al., *Inhibition of FLT3 signaling targets DCs to ameliorate autoimmune disease*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(46): p. 16741-6.
172. Zhang, Z., et al., *Parenchymal accumulation of CD163+ macrophages/microglia in multiple sclerosis brains*. J Neuroimmunol, 2011. **237**(1-2): p. 73-9.
173. Kreutzberg, G.W., *Microglia: a sensor for pathological events in the CNS*. Trends Neurosci, 1996. **19**(8): p. 312-8.
174. Fabrick, B.O., et al., *CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation*. Glia, 2005. **51**(4): p. 297-305.
175. Li, H., M.L. Cuzner, and J. Newcombe, *Microglia-derived macrophages in early multiple sclerosis plaques*. Neuropathol Appl Neurobiol, 1996. **22**(3): p. 207-15.
176. Oleszak, E.L., et al., *Inducible nitric oxide synthase and nitrotyrosine are found in monocytes/macrophages and/or astrocytes in acute, but not in chronic, multiple sclerosis*. Clin Diagn Lab Immunol, 1998. **5**(4): p. 438-45.
177. Simpson, J.E., et al., *Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions*. J Neuroimmunol, 1998. **84**(2): p. 238-49.
178. De Simone, R., et al., *The costimulatory molecule B7 is expressed on human microglia in culture and in multiple sclerosis acute lesions*. J Neuropathol Exp Neurol, 1995. **54**(2): p. 175-87.
179. Satoh, J., Y.B. Lee, and S.U. Kim, *T-cell costimulatory molecules B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) are expressed in human microglia but not in astrocytes in culture*. Brain Res, 1995. **704**(1): p. 92-6.
180. Ulvestad, E., et al., *HLA class II molecules (HLA-DR, -DP, -DQ) on cells in the human CNS studied in situ and in vitro*. Immunology, 1994. **82**(4): p. 535-41.
181. Tan, J., et al., *Activation of microglial cells by the CD40 pathway: relevance to multiple sclerosis*. J Neuroimmunol, 1999. **97**(1-2): p. 77-85.
182. Ponomarev, E.D., et al., *Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity*. J Neurosci Res, 2005. **81**(3): p. 374-89.
183. Heppner, F.L., et al., *Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis*. Nat Med, 2005. **11**(2): p. 146-52.
184. Dogan, R.N., A. Elhofy, and W.J. Karpus, *Production of CCL2 by central nervous system cells regulates development of murine experimental autoimmune encephalomyelitis through the recruitment of TNF- and iNOS-expressing macrophages and myeloid dendritic cells*. J Immunol, 2008. **180**(11): p. 7376-84.
185. Li, J., et al., *Differential expression and regulation of IL-23 and IL-12 subunits and receptors in adult mouse microglia*. J Neurol Sci, 2003. **215**(1-2): p. 95-103.
186. Cash, E., Y. Zhang, and O. Rott, *Microglia present myelin antigens to T cells after phagocytosis of oligodendrocytes*. Cell Immunol, 1993. **147**(1): p. 129-38.
187. Aloisi, F., et al., *Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation*. J Immunol, 1998. **160**(10): p. 4671-80.
188. Bartholomaeus, I., et al., *Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions*. Nature, 2009. **462**(7269): p. 94-8.

189. Ponomarev, E.D., L.P. Shriver, and B.N. Dittel, *CD40 expression by microglial cells is required for their completion of a two-step activation process during central nervous system autoimmune inflammation*. J Immunol, 2006. **176**(3): p. 1402-10.
190. Becher, B., et al., *The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system*. J Exp Med, 2001. **193**(8): p. 967-74.
191. Bailey, S.L., et al., *Innate and adaptive immune responses of the central nervous system*. Crit Rev Immunol, 2006. **26**(2): p. 149-88.
192. Ota, K., et al., *T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis*. Nature, 1990. **346**(6280): p. 183-7.
193. Sun, J.B., et al., *Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls*. Eur J Immunol, 1991. **21**(6): p. 1461-8.
194. Berthelot, L., et al., *Blood CD8+ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals*. Eur J Immunol, 2008. **38**(7): p. 1889-99.
195. Allegretta, M., et al., *T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis*. Science, 1990. **247**(4943): p. 718-21.
196. Strunk, T., et al., *Increased numbers of CCR5+ interferon-gamma- and tumor necrosis factor-alpha-secreting T lymphocytes in multiple sclerosis patients*. Ann Neurol, 2000. **47**(2): p. 269-73.
197. Bielekova, B., et al., *Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis*. J Immunol, 2004. **172**(6): p. 3893-904.
198. Zhang, J., et al., *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*. J Exp Med, 1994. **179**(3): p. 973-84.
199. Sharief, M.K. and E.J. Thompson, *Correlation of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor with clinical activity of multiple sclerosis*. J Neurol Neurosurg Psychiatry, 1993. **56**(2): p. 169-74.
200. Zang, Y.C., et al., *Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis*. J Immunol, 2004. **172**(8): p. 5120-7.
201. Bielekova, B., et al., *Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand*. Nat Med, 2000. **6**(10): p. 1167-75.
202. Stromnes, I.M. and J.M. Goverman, *Active induction of experimental allergic encephalomyelitis*. Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 1810-9.
203. Stromnes, I.M. and J.M. Goverman, *Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis*. Nat Protoc, 2006. **1**(4): p. 1952-60.
204. Larochelle, C., J.I. Alvarez, and A. Prat, *How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? FEBS Lett*, 2011. **585**(23): p. 3770-80.
205. Wong, D. and K. Dorovini-Zis, *Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by human brain microvessel endothelial cells in primary culture*. Microvasc Res, 1995. **49**(3): p. 325-39.
206. Schwab, N., T. Schneider-Hohendorf, and H. Wiendl, *Therapeutic uses of anti-alpha4-integrin (anti-VLA-4) antibodies in multiple sclerosis*. Int Immunol, 2015. **27**(1): p. 47-53.
207. Larochelle, C., et al., *Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system*. Brain, 2012. **135**(Pt 10): p. 2906-24.
208. Larochelle, C., et al., *Melanoma cell adhesion molecule-positive CD8 T lymphocytes mediate central nervous system inflammation*. Ann Neurol, 2015. **78**(1): p. 39-53.

209. Curis, C., et al., *Human T-Lymphotropic Virus Type 1-Induced Overexpression of Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule (ALCAM) Facilitates Trafficking of Infected Lymphocytes through the Blood-Brain Barrier*. J Virol, 2016. **90**(16): p. 7303-7312.
210. Cayrol, R., et al., *Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system*. Nat Immunol, 2008. **9**(2): p. 137-45.
211. Lyck, R., et al., *ALCAM (CD166) is involved in extravasation of monocytes rather than T cells across the blood-brain barrier*. J Cereb Blood Flow Metab, 2017. **37**(8): p. 2894-2909.
212. Lecuyer, M.A., et al., *Dual role of ALCAM in neuroinflammation and blood-brain barrier homeostasis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2017. **114**(4): p. E524-E533.
213. Gutcher, I. and B. Becher, *APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation*. J Clin Invest, 2007. **117**(5): p. 1119-27.
214. Panitch, H.S., et al., *Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon*. Lancet, 1987. **1**(8538): p. 893-5.
215. Segal, B.M. and E.M. Shevach, *IL-12 unmasks latent autoimmune disease in resistant mice*. J Exp Med, 1996. **184**(2): p. 771-5.
216. Baron, J.L., et al., *Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma*. J Exp Med, 1993. **177**(1): p. 57-68.
217. Bettelli, E., et al., *Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis*. J Exp Med, 2004. **200**(1): p. 79-87.
218. Lublin, F.D., et al., *Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis*. Autoimmunity, 1993. **16**(4): p. 267-74.
219. Ferber, I.A., et al., *Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)*. J Immunol, 1996. **156**(1): p. 5-7.
220. Willenborg, D.O., et al., *IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis*. J Immunol, 1996. **157**(8): p. 3223-7.
221. Cua, D.J., et al., *Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain*. Nature, 2003. **421**(6924): p. 744-8.
222. Langrish, C.L., et al., *IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation*. J Exp Med, 2005. **201**(2): p. 233-40.
223. Batten, M., et al., *Interleukin 27 limits autoimmune encephalomyelitis by suppressing the development of interleukin 17-producing T cells*. Nat Immunol, 2006. **7**(9): p. 929-36.
224. Tzartos, J.S., 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**(1): p. 146-55.
225. Matusevicius, D., et al., *Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis*. Mult Scler, 1999. **5**(2): p. 101-4.
226. Hedegaard, C.J., et al., *T helper cell type 1 (Th1), Th2 and Th17 responses to myelin basic protein and disease activity in multiple sclerosis*. Immunology, 2008. **125**(2): p. 161-9.
227. Babaloo, Z., et al., *The role of Th17 cells in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: interleukin-17A and interleukin-17F serum levels*. Immunol Lett, 2015. **164**(2): p. 76-80.
228. Carrieri, P.B., et al., *Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity*. Immunopharmacol Immunotoxicol, 1998. **20**(3): p. 373-82.
229. Monteyne, P., M.P. Van Antwerpen, and C.J. Sindic, *Expression of costimulatory molecules and cytokines in CSF and peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients*. Acta Neurol Belg, 1999. **99**(1): p. 11-20.

230. Kebir, H., et al., *Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis*. *Ann Neurol*, 2009. **66**(3): p. 390-402.
231. Mellergard, J., et al., *Natalizumab treatment in multiple sclerosis: marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid*. *Mult Scler*, 2010. **16**(2): p. 208-17.
232. Kebir, H., et al., *Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation*. *Nat Med*, 2007. **13**(10): p. 1173-5.
233. Murphy, A.C., et al., *Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis*. *Brain Behav Immun*, 2010. **24**(4): p. 641-51.
234. Hauser, S.L., et al., *Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions*. *Ann Neurol*, 1986. **19**(6): p. 578-87.
235. Booss, J., et al., *Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis*. *J Neurol Sci*, 1983. **62**(1-3): p. 219-32.
236. Planas, R., et al., *Detailed Characterization of T Cell Receptor Repertoires in Multiple Sclerosis Brain Lesions*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 509.
237. Fogdell-Hahn, A., et al., *Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease*. *Tissue Antigens*, 2000. **55**(2): p. 140-8.
238. Rubio, J.P., et al., *Analysis of extended HLA haplotypes in multiple sclerosis and narcolepsy families confirms a predisposing effect for the class I region in Tasmanian MS patients*. *Immunogenetics*, 2007. **59**(3): p. 177-86.
239. Killestein, J., et al., *Cytokine producing CD8+ T cells are correlated to MRI features of tissue destruction in MS*. *J Neuroimmunol*, 2003. **142**(1-2): p. 141-8.
240. Huseby, E.S., et al., *A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis*. *J Exp Med*, 2001. **194**(5): p. 669-76.
241. Sun, D., et al., *Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice*. *J Immunol*, 2001. **166**(12): p. 7579-87.
242. Sauer, B.M., W.F. Schmalstieg, and C.L. Howe, *Axons are injured by antigen-specific CD8(+) T cells through a MHC class I- and granzyme B-dependent mechanism*. *Neurobiol Dis*, 2013. **59**: p. 194-205.
243. Jurewicz, A., W.E. Biddison, and J.P. Antel, *MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes*. *J Immunol*, 1998. **160**(6): p. 3056-9.
244. Neumann, H., et al., *Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases*. *Trends Neurosci*, 2002. **25**(6): p. 313-9.
245. Bitsch, A., et al., *Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation*. *Brain*, 2000. **123 (Pt 6)**: p. 1174-83.
246. Tessier-Lavigne, M. and C.S. Goodman, *The molecular biology of axon guidance*. *Science*, 1996. **274**(5290): p. 1123-33.
247. Yurchenco, P.D. and W.G. Wadsworth, *Assembly and tissue functions of early embryonic laminins and netrins*. *Curr Opin Cell Biol*, 2004. **16**(5): p. 572-9.
248. Kappler, J., et al., *Glycosaminoglycan-binding properties and secondary structure of the C-terminus of netrin-1*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2000. **271**(2): p. 287-91.
249. Finci, L.I., et al., *The crystal structure of netrin-1 in complex with DCC reveals the bifunctionality of netrin-1 as a guidance cue*. *Neuron*, 2014. **83**(4): p. 839-849.
250. Bin, J.M., et al., *Full-length and fragmented netrin-1 in multiple sclerosis plaques are inhibitors of oligodendrocyte precursor cell migration*. *Am J Pathol*, 2013. **183**(3): p. 673-80.

251. Kennedy, T.E., et al., *Netrins are diffusible chemotropic factors for commissural axons in the embryonic spinal cord*. Cell, 1994. **78**(3): p. 425-35.
252. Colamarino, S.A. and M. Tessier-Lavigne, *The axonal chemoattractant netrin-1 is also a chemorepellent for trochlear motor axons*. Cell, 1995. **81**(4): p. 621-9.
253. Hong, K., et al., *A ligand-gated association between cytoplasmic domains of UNC5 and DCC family receptors converts netrin-induced growth cone attraction to repulsion*. Cell, 1999. **97**(7): p. 927-41.
254. Yebra, M., et al., *Recognition of the neural chemoattractant Netrin-1 by integrins alpha6beta4 and alpha3beta1 regulates epithelial cell adhesion and migration*. Dev Cell, 2003. **5**(5): p. 695-707.
255. De Breuck, S., et al., *Netrin-1 expression in fetal and regenerating rat pancreas and its effect on the migration of human pancreatic duct and porcine islet precursor cells*. Diabetologia, 2003. **46**(7): p. 926-33.
256. Dalvin, S., et al., *Expression of Netrin-1 and its two receptors DCC and UNC5H2 in the developing mouse lung*. Gene Expr Patterns, 2003. **3**(3): p. 279-83.
257. Liu, Y., et al., *Novel role for Netrins in regulating epithelial behavior during lung branching morphogenesis*. Curr Biol, 2004. **14**(10): p. 897-905.
258. Srinivasan, K., et al., *Netrin-1/neogenin interaction stabilizes multipotent progenitor cap cells during mammary gland morphogenesis*. Dev Cell, 2003. **4**(3): p. 371-82.
259. Park, K.W., et al., *The axonal attractant Netrin-1 is an angiogenic factor*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2004. **101**(46): p. 16210-5.
260. Wilson, B.D., et al., *Netrins promote developmental and therapeutic angiogenesis*. Science, 2006. **313**(5787): p. 640-4.
261. Mehlen, P., et al., *The DCC gene product induces apoptosis by a mechanism requiring receptor proteolysis*. Nature, 1998. **395**(6704): p. 801-4.
262. Llambi, F., et al., *Netrin-1 acts as a survival factor via its receptors UNC5H and DCC*. EMBO J, 2001. **20**(11): p. 2715-22.
263. Lai Wing Sun, K., J.P. Correia, and T.E. Kennedy, *Netrins: versatile extracellular cues with diverse functions*. Development, 2011. **138**(11): p. 2153-69.
264. Corset, V., et al., *Netrin-1-mediated axon outgrowth and cAMP production requires interaction with adenosine A2b receptor*. Nature, 2000. **407**(6805): p. 747-50.
265. Tu, T., et al., *CD146 acts as a novel receptor for netrin-1 in promoting angiogenesis and vascular development*. Cell Res, 2015. **25**(3): p. 275-87.
266. Ly, N.P., et al., *Netrin-1 inhibits leukocyte migration in vitro and in vivo*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(41): p. 14729-34.
267. Mirakaj, V., et al., *Repulsive guidance molecule-A (RGM-A) inhibits leukocyte migration and mitigates inflammation*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2011. **108**(16): p. 6555-60.
268. Rosenberger, P., et al., *Hypoxia-inducible factor-dependent induction of netrin-1 dampens inflammation caused by hypoxia*. Nat Immunol, 2009. **10**(2): p. 195-202.
269. Ranganathan, P.V., et al., *Netrin-1 regulates the inflammatory response of neutrophils and macrophages, and suppresses ischemic acute kidney injury by inhibiting COX-2-mediated PGE2 production*. Kidney Int, 2013. **83**(6): p. 1087-98.
270. Ramkhalawon, B., et al., *Hypoxia induces netrin-1 and Unc5b in atherosclerotic plaques: mechanism for macrophage retention and survival*. Arterioscler Thromb Vasc Biol, 2013. **33**(6): p. 1180-8.
271. Muramatsu, R., et al., *RGMA modulates T cell responses and is involved in autoimmune encephalomyelitis*. Nat Med, 2011. **17**(4): p. 488-94.

272. Moon, C., et al., *Enhanced expression of netrin-1 protein in the sciatic nerves of Lewis rats with experimental autoimmune neuritis: possible role of the netrin-1/DCC binding pathway in an autoimmune PNS disorder*. J Neuroimmunol, 2006. **172**(1-2): p. 66-72.
273. Mao, X., et al., *Netrin-1 attenuates cardiac ischemia reperfusion injury and generates alternatively activated macrophages*. Inflammation, 2014. **37**(2): p. 573-80.
274. Li, Y., et al., *Netrin-1 Promotes Inflammation Resolution to Achieve Endothelialization of Small-Diameter Tissue Engineering Blood Vessels by Improving Endothelial Progenitor Cells Function In Situ*. Adv Sci (Weinh), 2017. **4**(12): p. 1700278.
275. Xie, Z., et al., *Recombinant Netrin-1 binding UNC5B receptor attenuates neuroinflammation and brain injury via PPARgamma/NFkappaB signaling pathway after subarachnoid hemorrhage in rats*. Brain Behav Immun, 2018. **69**: p. 190-202.
276. Boneschansker, L., et al., *Netrin-1 Augments Chemokinesis in CD4+ T Cells In Vitro and Elicits a Proinflammatory Response In Vivo*. J Immunol, 2016. **197**(4): p. 1389-98.
277. Tadagavadi, R.K., W. Wang, and G. Ramesh, *Netrin-1 regulates Th1/Th2/Th17 cytokine production and inflammation through UNC5B receptor and protects kidney against ischemia-reperfusion injury*. J Immunol, 2010. **185**(6): p. 3750-8.
278. Teyssier, J.R., et al., *Upregulation of the netrin receptor (DCC) gene during activation of b lymphocytes and modulation by interleukins*. Biochem Biophys Res Commun, 2001. **283**(5): p. 1031-6.
279. Hadi, T., et al., *Macrophage-derived netrin-1 promotes abdominal aortic aneurysm formation by activating MMP3 in vascular smooth muscle cells*. Nat Commun, 2018. **9**(1): p. 5022.
280. van Gils, J.M., et al., *The neuroimmune guidance cue netrin-1 promotes atherosclerosis by inhibiting the emigration of macrophages from plaques*. Nat Immunol, 2012. **13**(2): p. 136-43.
281. Ramkhalawon, B., et al., *Netrin-1 promotes adipose tissue macrophage retention and insulin resistance in obesity*. Nat Med, 2014. **20**(4): p. 377-84.
282. Mirakaj, V., et al., *Netrin-1 dampens pulmonary inflammation during acute lung injury*. Am J Respir Crit Care Med, 2010. **181**(8): p. 815-24.
283. Schlegel, M., et al., *The neuroimmune guidance cue netrin-1 controls resolution programs and promotes liver regeneration*. Hepatology, 2016. **63**(5): p. 1689-705.
284. Aherne, C.M., C.B. Collins, and H.K. Eltzschig, *Netrin-1 guides inflammatory cell migration to control mucosal immune responses during intestinal inflammation*. Tissue Barriers, 2013. **1**(2): p. e24957.
285. Mediero, A., et al., *Netrin-1 and its receptor Unc5b are novel targets for the treatment of inflammatory arthritis*. FASEB J, 2016. **30**(11): p. 3835-3844.
286. Alvarez, J.I., et al., *The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence*. Science, 2011. **334**(6063): p. 1727-31.
287. Podjaski, C., et al., *Netrin 1 regulates blood-brain barrier function and neuroinflammation*. Brain, 2015. **138**(Pt 6): p. 1598-612.
288. Miloudi, K., et al., *Truncated netrin-1 contributes to pathological vascular permeability in diabetic retinopathy*. J Clin Invest, 2016. **126**(8): p. 3006-22.
289. Mulero, P., et al., *Netrin-1 and multiple sclerosis: a new biomarker for neuroinflammation?* Eur J Neurol, 2017. **24**(9): p. 1108-1115.
290. Voortman, M.M., et al., *Serum netrin-1 in relation to gadolinium-enhanced magnetic resonance imaging in early multiple sclerosis*. Mult Scler J Exp Transl Clin, 2017. **3**(3): p. 2055217317727294.

291. Wang, X., et al., *Expression of netrin-1 and its receptors, deleted in colorectal cancer and uncoordinated locomotion-5 homolog B, in rat brain following focal cerebral ischemia reperfusion injury*. *Neural Regen Res*, 2013. **8**(1): p. 64-9.
292. Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri, *NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis*. *Nat Methods*, 2012. **9**(7): p. 671-5.
293. Cooles, F.A.H., et al., *Phenotypic and Transcriptomic Analysis of Peripheral Blood Plasmacytoid and Conventional Dendritic Cells in Early Drug Naive Rheumatoid Arthritis*. *Front Immunol*, 2018. **9**: p. 755.
294. Sallusto, F. and A. Lanzavecchia, *Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha*. *J Exp Med*, 1994. **179**(4): p. 1109-18.
295. Vanderheyde, N., et al., *Inhibition of human dendritic cell functions by methylprednisolone*. *Transplantation*, 1999. **67**(10): p. 1342-7.
296. Moore, C.S., et al., *P2Y12 expression and function in alternatively activated human microglia*. *Neurol Neuroimmunol Neuroinflamm*, 2015. **2**(2): p. e80.
297. Farooque, A., et al., *Polarization of macrophages towards M1 phenotype by a combination of 2-deoxy-d-glucose and radiation: Implications for tumor therapy*. *Immunobiology*, 2016. **221**(2): p. 269-81.
298. Magatti, M., et al., *Human amnion favours tissue repair by inducing the M1-to-M2 switch and enhancing M2 macrophage features*. *J Tissue Eng Regen Med*, 2017. **11**(10): p. 2895-2911.
299. Marelli-Berg, F.M., et al., *An immunologist's guide to CD31 function in T-cells*. *J Cell Sci*, 2013. **126**(Pt 11): p. 2343-52.
300. Baroja, M.L., et al., *The anti-T cell monoclonal antibody 9.3 (anti-CD28) provides a helper signal and bypasses the need for accessory cells in T cell activation with immobilized anti-CD3 and mitogens*. *Cell Immunol*, 1989. **120**(1): p. 205-17.
301. Horton, C., K. Shanmugarajah, and P.J. Fairchild, *Harnessing the properties of dendritic cells in the pursuit of immunological tolerance*. *Biomed J*, 2017. **40**(2): p. 80-93.
302. Chai, J.G. and R.I. Lechler, *Immobilized anti-CD3 mAb induces anergy in murine naive and memory CD4+ T cells in vitro*. *Int Immunol*, 1997. **9**(7): p. 935-44.
303. Maggi, J., et al., *Therapeutic Potential of Hyporesponsive CD4(+) T Cells in Autoimmunity*. *Front Immunol*, 2015. **6**: p. 488.
304. Harding, F.A., et al., *CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones*. *Nature*, 1992. **356**(6370): p. 607-9.
305. Tan, P., et al., *Induction of alloantigen-specific hyporesponsiveness in human T lymphocytes by blocking interaction of CD28 with its natural ligand B7/BB1*. *J Exp Med*, 1993. **177**(1): p. 165-73.
306. Greenwald, R.J., et al., *CTLA-4 regulates induction of anergy in vivo*. *Immunity*, 2001. **14**(2): p. 145-55.
307. Bishop, K.D., et al., *Depletion of the programmed death-1 receptor completely reverses established clonal anergy in CD4(+) T lymphocytes via an interleukin-2-dependent mechanism*. *Cell Immunol*, 2009. **256**(1-2): p. 86-91.
308. Probst, H.C., et al., *Resting dendritic cells induce peripheral CD8+ T cell tolerance through PD-1 and CTLA-4*. *Nat Immunol*, 2005. **6**(3): p. 280-6.
309. Suss, G. and K. Shortman, *A subclass of dendritic cells kills CD4 T cells via Fas/Fas-ligand-induced apoptosis*. *J Exp Med*, 1996. **183**(4): p. 1789-96.

310. Waisman, A., et al., *Dendritic cells as gatekeepers of tolerance*. *Semin Immunopathol*, 2017. **39**(2): p. 153-163.
311. Baecher-Allan, C.M. and D.A. Hafler, *Functional analysis of highly defined, FACS-isolated populations of human regulatory CD4+CD25+ T cells*. *Clin Immunol*, 2005. **117**(2): p. 192; discussion 193.
312. Allan, S.E., et al., *Activation-induced FOXP3 in human T effector cells does not suppress proliferation or cytokine production*. *Int Immunol*, 2007. **19**(4): p. 345-54.
313. Crellin, N.K., et al., *Human CD4+ T cells express TLR5 and its ligand flagellin enhances the suppressive capacity and expression of FOXP3 in CD4+CD25+ T regulatory cells*. *J Immunol*, 2005. **175**(12): p. 8051-9.
314. Ruitenbergh, J.J., et al., *Rapid assessment of in vitro expanded human regulatory T cell function*. *J Immunol Methods*, 2011. **372**(1-2): p. 95-106.
315. Gurses, K.M., et al., *Netrin-1 is associated with macrophage infiltration and polarization in human epicardial adipose tissue in coronary artery disease*. *J Cardiol*, 2017. **69**(6): p. 851-858.
316. Yen, J.H., T. Khayrullina, and D. Ganea, *PGE2-induced metalloproteinase-9 is essential for dendritic cell migration*. *Blood*, 2008. **111**(1): p. 260-70.
317. Mehlen, P. and L. Mazelin, *The dependence receptors DCC and UNC5H as a link between neuronal guidance and survival*. *Biol Cell*, 2003. **95**(7): p. 425-36.
318. Mehlen, P. and C. Furne, *Netrin-1: when a neuronal guidance cue turns out to be a regulator of tumorigenesis*. *Cell Mol Life Sci*, 2005. **62**(22): p. 2599-616.
319. Hedrick, L., et al., *The DCC gene product in cellular differentiation and colorectal tumorigenesis*. *Genes Dev*, 1994. **8**(10): p. 1174-83.
320. Arakawa, H., *Netrin-1 and its receptors in tumorigenesis*. *Nat Rev Cancer*, 2004. **4**(12): p. 978-87.
321. Papanastasiou, A.D., et al., *Netrin-1 overexpression is predictive of ovarian malignancies*. *Oncotarget*, 2011. **2**(5): p. 363-7.
322. Delloye-Bourgeois, C., et al., *Interference with netrin-1 and tumor cell death in non-small cell lung cancer*. *J Natl Cancer Inst*, 2009. **101**(4): p. 237-47.
323. Harter, P.N., et al., *Netrin-1 expression is an independent prognostic factor for poor patient survival in brain metastases*. *PLoS One*, 2014. **9**(3): p. e92311.
324. Link, B.C., et al., *Prognostic implications of netrin-1 expression and its receptors in patients with adenocarcinoma of the pancreas*. *Ann Surg Oncol*, 2007. **14**(9): p. 2591-9.
325. Chen, J.Y., et al., *Netrin-1 promotes glioma growth by activating NF-kappaB via UNC5A*. *Sci Rep*, 2017. **7**(1): p. 5454.
326. Broutier, L., et al., *Targeting netrin-1/DCC interaction in diffuse large B-cell and mantle cell lymphomas*. *EMBO Mol Med*, 2016. **8**(2): p. 96-104.
327. Ylivinkka, I., et al., *Motility of glioblastoma cells is driven by netrin-1 induced gain of stemness*. *J Exp Clin Cancer Res*, 2017. **36**(1): p. 9.
328. Ramesh, G., A. Berg, and C. Jayakumar, *Plasma netrin-1 is a diagnostic biomarker of human cancers*. *Biomarkers*, 2011. **16**(2): p. 172-80.
329. Zhang, X., et al., *Netrin-1 elicits metastatic potential of non-small cell lung carcinoma cell by enhancing cell invasion, migration and vasculogenic mimicry via EMT induction*. *Cancer Gene Ther*, 2018. **25**(1-2): p. 18-26.
330. Yin, K., et al., *Netrin-1 promotes metastasis of gastric cancer by regulating YAP activity*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2018. **496**(1): p. 76-82.
331. Yin, K., et al., *Netrin-1 promotes gastric cancer cell proliferation and invasion via the receptor neogenin through PI3K/AKT signaling pathway*. *Oncotarget*, 2017. **8**(31): p. 51177-51189.

332. Krimpenfort, P., et al., *Deleted in colorectal carcinoma suppresses metastasis in p53-deficient mammary tumours*. Nature, 2012. **482**(7386): p. 538-41.
333. Yildirim, M.E., et al., *The value of plasma netrin-1 in non-small cell lung cancer patients as diagnostic and prognostic biomarker*. Tumour Biol, 2016. **37**(9): p. 11903-11907.
334. Kefeli, U., et al., *Netrin-1 concentrations in patients with advanced gastric cancer and its relation with treatment*. Biomarkers, 2012. **17**(7): p. 663-7.
335. Grandin, M., et al., *Inhibition of DNA methylation promotes breast tumor sensitivity to netrin-1 interference*. EMBO Mol Med, 2016. **8**(8): p. 863-77.
336. Paradisi, A., et al., *Combining chemotherapeutic agents and netrin-1 interference potentiates cancer cell death*. EMBO Mol Med, 2013. **5**(12): p. 1821-34.
337. Wischhusen, J., et al., *Ultrasound molecular imaging as a non-invasive companion diagnostic for netrin-1 interference therapy in breast cancer*. Theranostics, 2018. **8**(18): p. 5126-5142.