

Université de Montréal

**Modulation de la réponse immunitaire dans le cerveau
par la barrière hémato-encéphalique : implication en
sclérose en plaques**

par
Igal Ifergan

Département de microbiologie et immunologie
Faculté de Médecine

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

7 Octobre 2011

© Igal Ifergan, 2011

Université de Montréal
Faculté des études supérieures et postdoctorales

Cette thèse intitulée :

Modulation de la réponse immunitaire dans le cerveau par la barrière hémato-
encéphalique : implication en sclérose en plaques

Présenté par :

Igal Ifergan

a été évaluée par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Rejean Lapointe, président-rapporteur

Dr. Alexandre Prat, directeur de recherche

Dr. Michel Roger, membre du jury

Dr. Steve Lacroix, examinateur externe

Dr. Richard Robitaille, représentant du doyen

Résumé

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire du système nerveux central (SNC) caractérisée par une infiltration périvasculaire de cellules mononucléaires, telles que les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺, les lymphocytes B ainsi que les cellules myéloïdes qui comprend les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques (DCs). Ce phénomène d'infiltration est dû à une fragilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE). L'entrée des cellules immunitaires au SNC va mener à la destruction de la gaine de myéline et donc à l'apparition de plaques de démyélinisation.

Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que la migration des divers sous-types de cellules immunitaires du sang périphérique à travers la BHE est contrôlée par des mécanismes moléculaires distincts et spécifiques à chaque type cellulaire.

Afin de répondre à cette hypothèse, quatre différentes études ont été mises sur pieds. En premier lieu, nous démontrons un effet bénéfique des statines sur la BHE en SEP, en diminuant la migration des lymphocytes T et des monocytes, et en diminuant la diffusion de marqueurs moléculaire soluble. Ce phénomène s'opère via la suppression du processus d'isoprenylation, et en empêchant probablement la contraction des cellules endothéliales de la BHE.

De plus, nous démontrons que les monocytes qui migrent au SNC en condition inflammé sont en mesures de se différencier en DCs et d'induire une réponse inflammatoire de la part des lymphocytes T CD4⁺. La migration des monocytes à travers la BHE est contrôlée par une nouvelle molécule d'adhérence nommée Ninjurin-1. Le blocage de Ninjurin-1 conduit à une inhibition spécifique de la migration des monocytes *in vitro*, ainsi qu'à une amélioration des signes cliniques du modèle animal de la SEP, soit l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

Finalement, nous démontrons que la migration des lymphocytes T CD8⁺ au SNC s'effectue via l'intégrine $\alpha 4$. De plus, la majorité des lymphocytes T CD8⁺ que l'on retrouve dans le liquide céphalo-rachidien de patients SEP, dans le SNC de souris EAE ainsi que dans le SNC de souris infectée au virus de l'hépatite murine portent un phénotype

effecteur mémoire. Ces données pourraient expliquer l'émergence de leucoencéphalopathie multifocale progressive observée chez certains patients SEP traités au natalizumab, un anticorps dirigé contre l'intégrine $\alpha 4$.

En conclusion, notre étude a permis de démontrer l'importance des monocytes provenant de la périphérie dans le processus inflammatoire prenant part au SNC en SEP. L'inhibition d'entrée de ces cellules pourrait s'avérer bénéfique en SEP tout en permettant l'immuno-surveillance du cerveau, ce que l'anti- $\alpha 4$ intégrine ne permet pas. Les statines pourraient s'avérer une autre option intéressante puisqu'elles agissent sur les processus inflammatoires impliqués dans la SEP.

Mots-clés : Sclérose en plaques, Encéphalomyélite auto-immune expérimentale, Barrière hémato-encéphalique, Migration transendothéliales, Monocytes, Cellules Dendritiques, Lymphocytes T, Intégrine $\alpha 4$, Statines, Nerve injury-induced protein (Ninjurin)-1

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disorder of the central nervous system (CNS) characterized by multifocal areas of leukocyte infiltration and demyelination associated with a breakdown of the blood-brain barrier (BBB). Typically, demyelination is centered around perivascular accumulation of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, monocytes, macrophages and dendritic cells (DCs) that arise from migration of peripheral blood immune cells across the CNS microvascular endothelium.

We have thus suggested that the migration across the BBB of immune cells subsets from the blood is controlled by molecular mechanism specific for each cell type.

To answer this hypothesis, we have performed four different studies. We first show a beneficial effect of statins on the BBB, restricting the migration of lymphocytes and monocytes as well as the diffusion of soluble molecular tracers. This phenomenon is mediated through abrogation of isoprenylation processes that is probably inhibiting the ability of endothelial cells of the BBB to contract.

We also show that CD14⁺ monocytes migrate across the inflamed human blood BBB and differentiate into DCs in response to BBB-secreted TGF- β and GM-CSF. These DCs then promote the proliferation and expansion of inflammatory CD4⁺ T lymphocytes. We demonstrate that the migration of monocytes is controlled by a new adhesion molecule called Ninjurin-1. Ninjurin-1 neutralization specifically abrogated the adhesion and migration of human monocytes across endothelial cells of the BBB, without affecting lymphocyte recruitment. Moreover, Ninjurin-1 blockade reduced clinical disease activity and histopathological indices of experimental allergic encephalomyelitis (EAE).

Finally we show that migration of CD8⁺ T lymphocytes across BBB is dependent on α 4 integrin. Also, the majority of CD8⁺ T lymphocytes found in the cerebrospinal fluid of MS patients, and in the CNS of EAE mice as well as the CNS of mouse infected with hepatitis virus are showing an effector memory phenotype. These data could explain the numerous cases of progressive multifocal leukoencephalopathy seen in natalizumab treated MS patients.

In conclusion, our study unveils an important role of peripheral monocytes in MS. The inhibition of migration of these cells to the CNS could be a beneficial therapy since it would allow immune surveillance of the brain. The statins could also be a very interesting option since these molecules would reduce the inflammatory processes involved in MS.

Keywords : Multiple sclerosis, Experimental allergic encephalomyelitis, Blood-brain barrier, Migration, Monocytes, Dendritic cells, T lymphocytes, α 4 integrin, Statins, Nerve injury-induced protein (Ninjurin)-1

Table des matières

Résumé	i
Abstract	iii
Liste des tableaux	vii
Liste des figures	viii
Liste des Abréviations	ix
Remerciements	xiii
INTRODUCTION	1
1. Principes d'immunologie générale.....	1
1.1 Mécanismes de tolérance et maladies auto-immunes	8
2. La sclérose en plaques.....	12
2.1 Généralités.....	12
2.2 Facteurs génétiques en SEP : implication du CMH de classe II.....	13
2.3 Facteurs environnementaux de la SEP	14
2.4 Critères de diagnostic de la SEP	16
2.5 Les différentes formes de SEP	20
2.6 Agents infectieux : responsables de la SEP?	25
2.7 L'EAE : les différents modèles possibles	26
2.8 Mécanismes physiopathologiques de la SEP	31
3. Le système nerveux central et la barrière hémato-encéphalique	42
3.1 La barrière hémato-encéphalique.....	42
3.2 La barrière hémato-liquidienne	51
3.3 La migration des cellules immunitaires au SNC.....	54
4. Les traitements en sclérose en plaques	59
4.1 Généralités.....	59
4.2 Traitements actuellement prescrits.....	62
4.3 Traitements en essais.....	65
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	70

RÉSULTATS	73
Article 1: Statins Reduce Human Blood–Brain Barrier Permeability and Restrict Leukocyte Migration: Relevance to Multiple Sclerosis.....	73
Article 2: The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells	113
Article 3: Role of Ninjurin-1 in the Migration of Myeloid Cells to CNS Inflammatory Lesions	161
Article 4: CNS Recruitment of Effector Memory CD8 ⁺ T Lymphocytes During Neuroinflammation is Dependent on α 4 Integrin.....	211
DISCUSSION	269
1. Effets des statines sur la BHE humaine	269
2. Induction de la formation de cellules dendritiques suite à la migration des monocytes à travers la BHE.....	278
3. Ninjurin-1 est une molécule d'adhérence de la BHE permettant le recrutement spécifique des cellules de lignée monocytaire	283
4. Le recrutement des lymphocytes T CD8 ⁺ effecteurs mémoires dans le système nerveux central est dépendant de l' α 4 intégrine.....	289
CONCLUSION.....	295
BIBLIOGRAPHIE.....	297

Liste des tableaux

Tableau I: Critères de diagnostics de la sclérose en plaques.	21
Tableau II: Principaux modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale induits de manière actif.	28
Tableau III: Traitements actuels et en essais pour la sclérose en plaques.	60

Liste des figures

Figure 1: Différentiation des lymphocytes T CD4 ⁺ naïves en cellules effectrices.	6
Figure 2: Recouvrement des axones du système nerveux central par la myéline d'oligodendrocyte.....	17
Figure 3: Région démyélinisée d'une section de cerveau d'un patient atteint de sclérose en plaques.....	18
Figure 4: Présence de bandes oligoclonales d'IgG dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de sclérose en plaques.....	22
Figure 5: Schéma représentatif de la progression de la sclérose en plaques.....	24
Figure 6: Structure de la barrière hémato-encéphalique.....	44
Figure 7: Composition des jonctions serrées et adhérentes des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique.....	47
Figure 8: Structure de la barrière hémato-liquidienne.....	53
Figure 9: La migration transendothéliales des leucocytes.....	55
Figure 10: Modèle <i>in vitro</i> de la barrière hémato-encéphalique.....	271
Figure 11: Représentation de la voie métabolique du mévalonate.....	273
Figure 12: Schéma récapitulatif de l'étude sur les eDCs.....	281
Figure 13: Représentation schématique de la molécule et de la liaison homophile de Ninjurin-1.....	285

Liste des Abréviations

AICD:	Mort induite par activation
ALCAM:	Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule
AR-MS:	Acutely Relapsing MS patients
BCR:	Récepteurs aux cellules B
bFGF:	Basic fibroblast growth factor
BHE:	Barrière hémato-encéphalique
BSA:	Albumine de sérum bovin
CFA:	Adjuvant complet de Freund
CMH:	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPAs:	Cellules présentatrices d'antigène
DCs:	Cellules dendritiques
EAE:	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EBI-3:	EBV-induced gene 3
EBV:	Virus d'Epstein-Bar
eDCs:	endothelial cell-associated DCs
ESL-1:	E-Selectin Ligand 1
Fas-L:	Fas-Ligand
FITC:	Fluorescéine-5-isothiocyanate
FPP:	Farnésylpyrophosphates
GDNF:	Glial cell line-derived neurotrophic factor
GFAP:	Glial fibrillary acidic protein
GGPP:	Géranylgéranylpyrophosphates
GLYCAM-1:	Glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1
GM-CSF:	Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor
HA:	Hemagglutinine du virus influenza
HHV-6:	Virus herpétique humain 6

HMG-CoA:	3-hydroxy-3-méthhylglutaryl coenzyme A
i.p.:	Intrapéritonéale
ICAM-1:	Intercellular Cell Adhesion Molecule 1
IFN:	Interféron
IgG:	Immunoglobulines d'isotype G
IL:	Interleukine
IP-10:	Interferon gamma-induced protein 10
IPEX:	immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome
IRM:	Imagerie par résonance magnétique
iTregs:	Tregs induites
JA:	Jonctions adhérentes
JAMs:	Junctional adhesion molecules
JC:	John Cunningham
JS:	Jonctions serrées
KO:	Knockout
LCR:	Liquide céphalo-rachidien
LEMP:	Leucoencéphalopathie multifocale progressive
LFA-1:	Lymphocyte Function associated Antigen 1
LPAM-1:	Lymphocyte Peyer's patch Adhesion Molecule 1
MAdCAM-1:	Mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1
MALT:	Formations lymphatiques associées aux muqueuses
MBP:	Protéine basique de la myéline
MCP-1:	Monocyte chemoattractant protein 1
MHV:	Virus de l'hépatite murine
MIP-1 α :	Macrophage inflammatory protein 1 α
MMPs:	Métalloprotéinase matricielle
MOG:	Glycoprotéine de la myéline d'oligodendrocytes
MRP-1:	Multidrug resistance protein-1

Ninjurin-1:	Nerve injury-induced protein-1
NK:	Cellules « natural killers »
nTregs:	Tregs naturels
pDCs:	DCs plasmacytoïdes
PECAM-1:	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
PLP:	Protéolipide de la myéline
PP-MS:	SEP progressives primaires
PSGL-1:	P-Selectin Glycosylated Ligand 1
PTX:	Toxine pertussique
RANTES:	Regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted
Rc:	Récepteur
RR-MS:	SEP à forme rémittente-récurrente
SCI:	Syndrome cliniquement isolé
SEP:	Sclérose en plaques
SNC:	Système nerveux central
SP-MS:	SEP progressive secondaire
TCM:	Cellules T mémoire centrale
TCR:	Récepteurs des cellules T
TEER:	Résistance électrique trans-endothéliale
TEM:	Cellules T mémoire effectrices
TGF:	Facteur de croissance transformant
TNF:	Facteur de nécrose tumorale
Tregs:	Cellules T régulatrices
VCAM-1:	Vascular Cell Adhesion Molecule 1
VIH:	Virus de l'immunodéficience humaine
VLA-4:	Very Late Antigen 4
WT:	Sauvage

*Je dédie cette thèse à tous ceux qui m'auront
tendu la main, et qui auront cru en moi*

Remerciements

Trouver les bons mots pour remercier et exprimer ma gratitude envers les personnes qui m'ont aidé et supporté lors de mon doctorat est certainement la tâche la plus difficile de cette thèse. Au fil des années, il m'est souvent arrivé de perdre ma motivation, mon désir de vouloir changer les choses, d'être désabusé d'un système qui est souvent injuste et de perdre cet idéal qui faisait en sorte que j'allais au labo tous les jours. Mais heureusement, certaines personnes ont su trouver les mots, les gestes qui fallaient pour faire revivre ce feu intérieur, car avouons-le, aucune recherche ne se fait sans qu'il y ait derrière des personnes passionnées. La première personne qui aura su me redonner espoir que la recherche était encore une noble vocation est certainement mon superviseur, le Dr. Alexandre Prat. Suite à un douloureux passage de deux ans dans un laboratoire à McGill, ma vision de la recherche était plutôt médiocre et en était une presque mercantile. Non pas que les chercheurs doivent vivre d'amour et d'eau fraîche (loin de moi cette idée-là!), mais je pense que toute bonne recherche doit se faire dans le but de faire avancer la science et éventuellement, élaborer de nouveaux outils nécessaires à améliorer le bien-être de l'homme. La vision du Dr. Prat concernant la recherche était et est noble, il utilise ses connaissances et ses valeurs dans le but de faire avancer la recherche sur la sclérose en plaques. C'est une personne brillante et humaine, il a une gestion du personnel qui lui est très propre et qui peut se comparer à un système Marxiste où tous les membres du labo travaillent pour le même objectif, c'est-à-dire la réalisation de projets. Bien que surprenant, sa gestion de personnel fonctionne à merveille et donne des résultats impressionnants. Je ne le remercierais jamais assez de m'avoir offert cette opportunité de faire mon doctorat dans son laboratoire. Le destin a bien fait les choses finalement! Ce fut un mentor exceptionnel, il m'a permis de m'exprimer, d'oser, d'aller au bout de mes idées tout en étant encadré dans un environnement exceptionnel où la seule limite était celle de l'imagination. Merci Alex pour tout ça, et pour les conférences, les soupers, ton sens de l'humour, ton humanisme, et ta confiance en moi.

Il y a plusieurs membres du laboratoire du Dr. Alexandre Prat à qui je dois beaucoup. La personne la plus importante aura certainement été Hania Kebir, qui aura été de toutes les batailles. Par sa curiosité, son intelligence, son désir d'accomplissement, sa ténacité à vouloir changer les choses, elle aura su me pousser encore plus loin, plus loin que je ne l'aurais imaginé. Elle aura su m'inculquer le vrai sens des mots courage, dévouement et détermination. Je l'admire tant, j'espère que sa modestie ne fera pas en sorte qu'elle diminue sa contribution à ma réussite. Ce n'est que suite à sa venue au labo que la partie immunologique a vraiment pris son envol, et s'est développée rapidement. Aujourd'hui, tous les projets du labo comportent une partie immunologique, et c'est certainement en grande partie grâce à elle. J'ai beaucoup appris en travaillant à ses côtés, tant au niveau humain qu'au niveau scientifique. Au fil des années, notre amitié s'est nourrie de discussions scientifiques, de défis, d'accomplissements, de voyages en conférence, d'entraide, de moments parfois plus difficiles mais aussi souvent plus heureux. Comme le dirait Otis avec sa verve et passion si caractéristique : j'aime la vie, je chante la vie, je lui dis merci de t'avoir mis sur mon chemin! Car ce n'est pas seulement elle que j'ai appris à connaître au fil des ans, mais aussi sa famille qui est tout aussi exceptionnelle, autant ses parents que ses sœurs et son frère. Hania, peu importe les décisions que tu prendras face à ton avenir, je suis certain que ta carrière sera pavée de succès. Merci pour ton amitié, support et entraide au cours de ces années, tu es associée à tous mes meilleurs souvenirs du labo. À quand la prochaine expérience secrète!

Je voudrais prendre quelques lignes pour remercier quelques personnes qui m'auront particulièrement marqué au sein du laboratoire du Dr. Alexandre Prat. Tout d'abord la Dr. Karolina Wosik, qui fut responsable de mon embauche au labo. Elle aura su me guider dans ma relation avec le Dr. Alexandre Prat, et me montrer qu'affirmer ses idées en science n'est pas proscrit! Aussi merci à Monique Bernard qui par sa générosité, son sens de l'humour et son calme amena très souvent un précieux réconfort. Romain Cayrol avec qui les débats scientifiques étaient très souvent intéressants. Aurore Dodelet-Devillers, souvent appelée le bébé du lab (seulement 19 ans à son arrivée), s'est très rapidement

démarquée par son immense gentillesse, sourire et vivacité d'esprit. Son départ a laissé un grand vide, et l'ambiance si vivante lorsqu'elle était présente est devenue moins enjouée. J'aimerais aussi remercier Lyne Bourbonnière, avec qui j'ai passé beaucoup de bons moments, et qui aura été d'une grande sagesse à de nombreuses reprises. Je remercie aussi le Dr. Mike Sabbagh avec qui j'aurais vécu le moment le plus traumatisant de mon doctorat, un « road-trip » en pleine nuit à Sherbrooke. Un merci également au Dr. Jorge Alvarez qui m'aura beaucoup appris au niveau des immunostainings et de la microscopie, deux domaines qui m'auront longtemps effrayé! Mais aussi, c'est une personne avec qui on ne s'ennuie jamais! Je me souviens particulièrement de nos soirées lors de conférences qui furent tout le temps empruntées de rires et de joies. Aussi, un merci à Simone Terouz, qui a toujours su faire preuve d'une grande gentillesse et dévouement. Finalement, merci aux membres plus récents du labo : Lamia Hachehouhe, Olivia Saint-Laurent, Conni Podjaski, Marc-André Lécuyer, Dr. Steve Gendron, Dr. Catherine Larochelle, Dr. Akiko Nakano pour leur aide et support.

Dans mes remerciements, je ne peux pas passer sous silence l'immense contribution du Dr. Nathalie Arbour à mon cheminement. Elle m'a grandement aidé lors des moments plus difficiles lorsque j'étais à McGill avec des conseils très judicieux. Plus tard, lors de mon arrivée au laboratoire du Dr. Alexandre Prat, elle fut d'une aide incommensurable pour la réalisation d'une grande partie de mes projets. En plus d'être toujours disponible pour discuter de science, de recherche, ou simplement de la vie, ses connaissances de l'immunologie sont sans égales, et son enthousiasme pour la recherche très contagieux!

Je tiens à remercier les membres du laboratoire du Dr. Nathalie Arbour : Diane Beauseigle, le Dr. Raphael Schneider, Teodora Yanova, Lama El-Khoury, Alma Mohebiany, la Dr. Emilie Vieil et spécialement Fatma Zaguia et Camille Pittet. Au Dr. Raphael Schneider, merci d'avoir eu la patience et l'amabilité de prélever du sang. À Fatma et Camille, merci pour votre amitié, votre support, votre présence, vous n'avez pas idée à quel point je vous apprécie et vous voue une affection sans borne. Vous avez su créer une ambiance qui me donnait envie de venir au labo même si je n'avais pas à être présent!

Merci à vous deux et bonne chance dans vos carrières et vies de famille!

J'aimerais aussi remercier quelques autres personnes du centre de recherche et de l'université de Montréal : Le Dr. Rejean Lapointe et tout son labo, le Dr. Philippe Ganon, le Dr. Jean-François Cailhier, la Dr. Johanne Poudrier, Geneviève Boily-Larouche, le Dr. Hugo Soudeyans ainsi que le Dr. Georges Szatmari. Je tiens à remercier aussi les labos du groupe de Neuroinflammation, et en particulier, le Dr. Jack Antel et son groupe avec en tête de liste Manon Blain. Toutes ces personnes ont contribué d'une façon ou d'une autre à mon développement. Un merci additionnel à la fondation de la sclérose en plaques.

Je remercie également les membres de la clinique de la sclérose en plaques, en particulier, le Dr. Pierre Duquette et les infirmières de recherche, dont Josée Poirier. Un énorme merci aux patients pour leurs dons de sang et de liquide céphalo-rachidien. Chaque rencontre avec l'un d'eux était une véritable source d'inspiration.

D'un point de vue personnel, il y a quelques personnes à qui je dois beaucoup. La Dr. Joséphine Aho que je connais depuis le tout début du bac à l'université de Montréal et qui est une précieuse amie. Elle a toujours su me donner le juste conseil. Mes amis gars, Julien, Sébastien, Edy, Jonas et Laurent! Je me rappellerais toujours de ce fameux samedi soir où vous avez transporté notre soirée au labo puisque j'avais à finir des expériences! Que de rires! À mon groupe de théâtre, La TRAC, qui aura su me faire déconnecter de la science, et me donner des défis exaltants! Et bien sûr, Alejandra Cifuentes-Diaz qui m'a offert un support de tous les instants et qui tentaient de mille et une façons de me faire déconnecter de la recherche! Merci pour tout Alejandra!

En dernier lieu, je tiens à remercier ma famille sans qui rien de tout cela n'est possible. Mes parents ont fait d'énormes sacrifices pour que je puisse étudier et aller à l'université, et cet amour qu'ils m'ont porté a fait en sorte que je me suis toujours relevé quand j'étais abattu. À mes frères, Patrick et Gad, ma sœur, Nathalie, mon beau-frère, Jacky, ma belle-sœur, Ortal, et ma magnifique nièce, Célia, merci pour votre support et

d'avoir créé un environnement familial où vous avez accepté toutes mes décisions. Un énorme merci pour votre présence, je vous aime tant.

INTRODUCTION

1. Principes d'immunologie générale

Le système immunitaire est composé d'un ensemble de cellules disséminées dans la plupart des tissus, circulant par le sang et la lymphe, et venant de et allant vers les organes lymphoïdes. Il existe deux types d'organes lymphoïdes: les primaires qui sont la moelle osseuse ainsi que le thymus et les secondaires qui sont la rate, les ganglions lymphatiques ainsi que les formations lymphatiques associées aux muqueuses (aussi appelées MALT). Les cellules du système immunitaire, les leucocytes, se développent dans les organes lymphoïdes primaires et prolifèrent suite à une attaque d'un pathogène dans les organes lymphoïdes secondaires. Tous les tissus ont un réseau de vaisseaux lymphatiques à l'exception du système nerveux central (SNC) et des os.

La réponse immune peut être divisée en deux, la réponse innée ou non-spécifique et la réponse adaptative ou spécifique, chacune ayant des globules blancs qui lui sont associées. Les cellules composant le système immunitaire inné sont : les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques (DCs), les cellules « natural killers » (NK), les granulocytes (neutrophiles, basophiles et éosinophiles), les mastocytes et les plaquettes. Ces cellules constituent la première ligne de défense contre des pathogènes et conduisent à la réponse immunitaire innée qui est mise en œuvre immédiatement suite au signal de danger. Cependant ces cellules sont incapables de mémoire et sont non-spécifiques. Contrairement à l'immunité innée, le développement d'une immunité adaptative découle de la reconnaissance propre au pathogène par des lymphocytes B ou T, dotés de récepteurs spécialisés, interaction qui entraîne leur prolifération et leur différenciation en lymphocytes B et T effecteurs dans les organes lymphoïdes secondaires, puis en cellules mémoires. Cette réponse comprend donc 4 phases: (i) une phase d'activation suivie (ii) d'une phase d'expansion clonale, (iii) d'une phase de contraction clonale et (iv) d'une phase de maintien des cellules mémoires. Il y a donc création d'une mémoire immunologique qui se fait à l'égard d'un fragment du pathogène (aussi appelé antigène), ce qui aura pour conséquence

une activation plus rapide du système immunitaire adaptatif face à une nouvelle intrusion du même pathogène.

Dans le cas des lymphocytes T, leur activation nécessite que l'antigène soit apprêté sous forme de peptides associés aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I ou de classe II exprimées à la surface de cellules présentatrices d'antigène (CPAs). L'activation des lymphocytes T requiert la reconnaissance du complexe CMH-peptide et de signaux de costimulation présentés par la même CPA. Une CPA est donc définie par sa capacité à capturer des antigènes et à présenter des peptides sur les molécules de CMH en plus de posséder des molécules de costimulation, telles que CD80 (B7.1), CD86 (B7.2) et CD40. Les seules cellules possédant ces caractéristiques sont les DCs, les macrophages, les monocytes et les lymphocytes B. Cependant, il est admis que les DCs sont les plus efficaces dans l'activation des lymphocytes T naïfs. Lorsqu'un CPA capture un antigène dans un tissu, il va avoir le choix de rester dans le tissu pour présenter le peptide aux cellules T déjà présentes (qui sont donc effectrices), ou de migrer dans les organes lymphoïdes secondaires dans le but d'activer des lymphocytes T naïfs. Les lymphocytes T naïfs qui sont dans les organes lymphoïdes secondaires vont rentrer en contact avec des milliers de CPAs dans le but de scanner les peptides à la surface du CMH pour initier leur activation et leur différenciation en cellule effectrice. Après reconnaissance du complexe CMH-peptide, le lymphocyte T est activé ce qui va entraîner une expansion clonale. Tous les lymphocytes T ainsi produits seront spécifiques pour le même peptide. Une fois que l'agent infectieux est éliminé, la plupart (environ 95%) des lymphocytes T effecteurs sont éliminés mais une petite partie des lymphocytes T (environ 5%) se différencient en cellules mémoires (Ahmed and Gray, 1996; Wherry and Ahmed, 2004). Il existe deux sous-populations de cellules mémoires: les cellules T mémoire centrale (TCM) et les cellules T mémoire effectrice (TEM). Les deux sous-populations de cellules mémoires (TCM et les TEM) ont été identifiées tant chez l'homme que chez la souris. Les TEM auraient un rôle important dans la réponse immédiate en raison de leurs fortes et rapides capacités effectrices (entre autre la production de cytokines) ainsi que leur

localisation en périphérie (sang et tissus non-lymphoïdes), proche des sites d'entrée des pathogènes. Les TEM sont aussi caractérisés par leur faible capacité à proliférer suite à une stimulation antigénique (Huster *et al.*, 2006; Kalia *et al.*, 2006; Sallusto *et al.*, 2004). En ce qui concerne les TCM, ils sont localisés préférentiellement au niveau des organes lymphoïdes secondaires et possèdent des faibles capacités effectrices immédiates, mais une forte capacité d'expansion (Huster *et al.*, 2006; Sallusto *et al.*, 2004; Sprent and Surh, 2001). Chez l'homme et chez la souris, les phénotypes des TEM et des TCM sont respectivement $CCR7^- CD62L^-$ et $CCR7^+ CD62L^+$ (Sallusto *et al.*, 1999). Ces deux protéines de surface, CCR7 et CD62L, permettent aux cellules qui les expriment de migrer aux organes lymphoïdes secondaires (Butcher and Picker, 1996; Gunn *et al.*, 1999). Ainsi, les TEM qui n'expriment pas ces protéines vont patrouiller les tissus pour des subséquentes intrusions de l'agent pathogène dans le but d'induire une réponse effectrice rapide et spécifique.

Il existe deux principaux sous-types de lymphocytes T qui se distinguent par la présence des molécules de surface CD4 pour les lymphocytes T $CD4^+$ ou CD8 pour les lymphocytes T $CD8^+$. Les lymphocytes T $CD4^+$ reconnaissent les complexes CMH de classe II et peptide alors que les lymphocytes T $CD8^+$ reconnaissent les complexes CMH de classe I et peptide.

Les lymphocytes T $CD8^+$ sont aussi nommés les lymphocytes T cytotoxiques en raison de leur capacité à libérer des enzymes cytotoxiques telles que le granzyme A, le granzyme B et la perforine. Ces enzymes permettent de dégrader les protéines à l'intérieur d'une cellule cible et d'en induire la mort cellulaire programmée (aussi appelé apoptose) (Kurschus *et al.*, 2005; Peters *et al.*, 1991; Pipkin and Lieberman, 2007). Les lymphocytes T $CD8^+$ peuvent également induire l'apoptose de cellules cibles via la voie Fas – Fas-Ligand (Fas-L) (Siegel *et al.*, 2000) et par la sécrétion de cytokine pro-apoptotique comme le facteur de nécrose tumorale (TNF)- α (Harty *et al.*, 2000). Les lymphocytes T $CD8^+$ produisent aussi différentes cytokines après activation. Ainsi les lymphocytes T $CD8^+$ effecteurs se caractérisent principalement par la sécrétion d'interféron (IFN)- γ , de TNF- α et

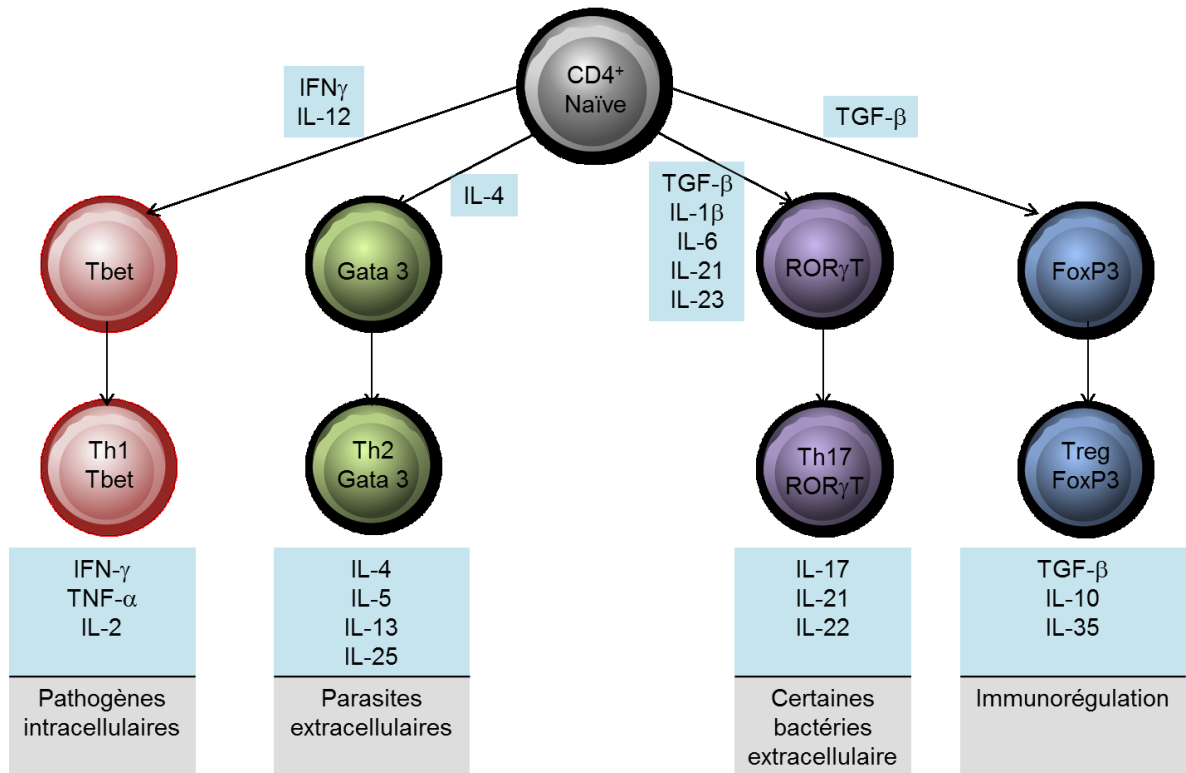
d'interleukine (IL)-2. Ces cytokines ont des rôles très divers: l'IFN- γ est reconnu pour augmenter l'expression de CMH de classe I sur les CPAs ou les cellules cibles (Fruh and Yang, 1999) et pour activer l'activité microbicide d'autres types cellulaires. Quant à l'IL-2, cette cytokine possède un effet autocrine sur les lymphocytes T en stimulant leur activation et prolifération (Ben Aribia *et al.*, 1987; Bich-Thuy *et al.*, 1987). Les lymphocytes T CD8⁺ sont surtout reconnus pour leur rôle protecteur lors d'infection virale. Autant les lymphocytes T CD8⁺ effecteurs que les CD8⁺ TEM possèdent des capacités effectrices très importantes (production d'IFN- γ et d'enzymes cytolytiques), alors que les CD8⁺ TCM sont très limités dans ce domaine (Huster *et al.*, 2006; Sallusto *et al.*, 2004). Diverses études ont montré que les signaux délivrés par les lymphocytes T CD4⁺ et l'IL-2 seraient indispensables à l'expansion de lymphocytes T CD8⁺ activés et à leur différenciation de cellules effectrices en cellules mémoires et à leur maintien (Bachmann *et al.*, 2004; Bachmann *et al.*, 2005; Janssen *et al.*, 2003; Rocha and Tanchot, 2004; Shedlock and Shen, 2003; Shedlock *et al.*, 2003; Sun and Bevan, 2003; Williams and Bevan, 2007).

Les lymphocytes T CD4⁺ sont également appelés lymphocytes T auxiliaires (ou « helper » en anglais), et comme son nom l'indique, ces cellules apportent un soutien, une aide aux autres cellules immunitaires. En effet, les lymphocytes T CD4⁺ permettent l'activation et la régulation d'une panoplie de cellules dans le but d'induire une réponse immunitaire de type humorale, caractérisée par l'activation et la production d'anticorps par les lymphocytes B, ou de type cellulaire, caractérisée par l'activation de macrophages, de cellules NK ainsi que de lymphocytes T CD8⁺ antigène-spécifique. Ainsi les lymphocytes CD4⁺ peuvent être perçus comme des chefs d'orchestre contrôlant la majorité des participants à une réaction immunitaire.

Les lymphocytes T CD4⁺ peuvent être sous-divisés en fonction des cytokines qu'ils produisent (Mosmann *et al.*, 1986). Ainsi, on retrouve les lymphocytes Th1 produisant de l'IFN- γ , du TNF- α et de l'IL-2. Les lymphocytes Th2 sont reconnus comme étant producteurs d'IL-4, IL-5, IL-9, IL-10, IL-13 et IL-25. Finalement les lymphocytes Th17 produisent de l'IL-17, IL-21 et IL-22. Ces phénotypes des lymphocytes T CD4⁺ sont

dépendants des cytokines présentes dans l'environnement avoisinant leur activation. Ces cytokines présentes dans l'environnement vont activer des facteurs de transcription spécifiques au sein des lymphocytes T et induire la sécrétion des cytokines caractéristiques des sous-populations de CD4 (Figure 1). Ainsi un environnement riche en IL-12 et IFN- γ va activer l'expression du facteur nucléaire T-bet, et induire un phénotype Th1. Un environnement riche en IL-4 stimule l'expression du facteur nucléaire GATA-3 et pousse vers un phénotype Th2. Finalement un environnement riche en facteur de croissance transformant (TGF)- β , IL-6, IL-21, et IL-23 active l'expression du facteur nucléaire ROR γ pour ainsi induire un phénotype Th17. Cependant la contribution exacte ainsi que l'interchangeabilité de chacune de ces cytokines responsables du phénotype en Th17 restent encore à démêler. Néanmoins, il demeure clair que l'IL-23 est au moins essentiel pour stabiliser le phénotype Th17. Effectivement, les souris dont le récepteur (rc) à l'IL-23 a été supprimé génétiquement (on désigne ces souris par le terme knockout ou KO, et dans ce cas-ci, ces souris sont nommées IL-23rc KO) possèdent un défaut de génération de lymphocytes Th17 (McGeachy *et al.*, 2009).

Chacune des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ accomplit des fonctions bien définies. L'infection des cellules immunitaires du système innée par des bactéries intracellulaires et des virus induit la production d'IL-12 par les cellules infectées ce qui va activer la différenciation de cellules CD4 naïves en Th1 et ainsi permettre une réponse immunitaire de type cellulaire. D'autre part, une infection par des parasites extracellulaires tels que les helminthes induit la production d'IL-4 par les cellules du système immunitaire innée conduisant la différenciation de cellules CD4 naïves en Th2 et ainsi activer une réponse immunitaire de type humorale. En ce qui a trait au troisième sous-type de lymphocytes T CD4⁺, les Th17, leur fonction demeure imprécise pour l'instant. On sait que les cellules Th17 sont naturellement présentes dans les organes lymphoïdes du tractus intestinal et l'IL-17 est constitutivement exprimée dans ce tissu, suggérant un rôle essentiel



Adapté de Reiner *et al.*, *Cell*, 2007

Figure 1: Différentiation des lymphocytes T CD4⁺ naïves en cellules effectrices.

Représentation des cytokines importantes pour l'induction des différentes sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ chez l'humain. Les facteurs nucléaires ainsi que les principales cytokines produites par les sous-populations sont aussi représentées dans la figure. La principale fonction connue pour chacune des sous-populations de lymphocytes T CD4⁺ est indiquée en bas de chacune des cellules.

de cette population dans le maintien de l'intégrité et de l'homéostasie de la barrière intestinale. De plus, on leur attribue un rôle important dans le contrôle des infections pulmonaires à *Klebsiella pneumoniae*, aux infections intestinales à *Citrobacter rodentium*, et aux infections systémiques à *Candida albicans*. Par ailleurs, les cellules épithéliales et endothéliales expriment les récepteurs à l'IL-17 et à l'IL-22, et répondent à ces deux cytokines par la production de chimiokines et de cytokines pro-inflammatoires dans le but de recruter des cellules immunitaires additionnelles et ainsi d'amplifier la réponse immunitaire locale. On pense donc que les cellules Th17 pourraient initier de nombreuses réactions inflammatoires du système immunitaire, en plus d'être possiblement à l'origine de nombreuses maladies auto-immunitaires.

Il existe un dernier sous-type de lymphocytes CD4⁺ qui sont les cellules T régulatrices (Tregs). Les Tregs sont caractérisés par l'expression constitutive du récepteur de haute affinité à l'IL-2, soit le CD25, exprime le facteur de transcription Foxp3, et possèdent un rôle qui se situe à l'opposé des autres lymphocytes CD4⁺, c'est-à-dire que plutôt d'activer les cellules immunitaires, les Tregs vont tempérer les réactions immunitaires. Les lymphocytes T présentant un phénotype régulateur directement suite à leur maturation dans le thymus sont désignés comme étant des Tregs naturels (nTregs) (Sakaguchi, 2004). Cependant, il est possible pour des lymphocytes T naïfs en circulation d'acquérir un phénotype régulateurs, et sont donc nommés Tregs induits (iTregs) (Chen *et al.*, 2003). La population de Tregs retrouvée *in vivo* est constituée par les deux types de Tregs, les nTregs et les iTregs représentent environ 10% du total des lymphocytes T CD4⁺ retrouvés en périphérie. Les deux types de Tregs ont des fonctions très similaires en agissant de façon à contrôler les réactions immunitaires au sein des tissus (Curotto de Lafaille and Lafaille, 2009). Il n'existe pratiquement aucune donnée sur les nTregs humaines, puisqu'à ce jour, aucune protéine distincte n'a été identifiée permettant de différencier les nTregs des iTregs. Cependant les travaux sur les animaux, et en particulier sur les souris, nous permettent de déterminer que le développement des nTregs nécessite la présence dans le thymus d'IL-2, d'IL-7 (Malek *et al.*, 2008) ainsi qu'une stimulation

antigénique d'une protéine du soi initiée par les cellules épithéliales du thymus et/ou par les DCs (Picca *et al.*, 2006). Quant aux iTregs, il a été démontré qu'une stimulation antigénique (soi ou non-soi) en présence d'IL-2, de la cytokine TGF- β et/ou de l'acide rétinoïque, un métabolite de la vitamine A, induisait l'expression de Foxp3 par lymphocytes T naïfs (Benson *et al.*, 2007; Chen *et al.*, 2003).

Les Tregs agissent soit par la sécrétion de cytokines telles que l'IL-10 (Asseman *et al.*, 1999), l'IL-35 (Collison *et al.*, 2007) et le TGF- β (Nakamura *et al.*, 2001), soit par l'induction de la mort cellulaire en produisant des enzymes cytolytiques telles que perforine et granzyme B (Cao *et al.*, 2007; Gondek *et al.*, 2005), soit en épuisant l'environnement d'IL-2 qui est nécessaire aux lymphocytes T pour leur activation (Pandiyani *et al.*, 2007), ou soit par contact cellulaire sur les DCs en inhibant leur maturation et leur fonction (Tadokoro *et al.*, 2006; Tang *et al.*, 2006). Il a été suggéré que les Tregs jouent un rôle primordial dans le contrôle des maladies auto-immunitaires.

1.1 Mécanismes de tolérance et maladies auto-immunes

Les maladies auto-immunes sont caractérisées par une attaque des constituants du soi par le système immunitaire. Lors de la formation des lymphocytes T et B, les récepteurs pour l'antigène sont générés au hasard par le processus de recombinaison des différents segments géniques V, D et J codant pour les domaines variables de ces molécules. Entre 20 et 50% des récepteurs des cellules T (TCR) et des récepteurs aux cellules B (BCR) ont une affinité potentiellement dangereuse pour les antigènes du soi. L'élimination de ces clones autoréactifs implique donc des mécanismes de tolérance immunitaire.

Les mécanismes de tolérance lymphocytaire se divisent en deux catégories: une tolérance centrale, survenant dans les organes lymphoïdes primaires (thymus pour les cellules T et moelle osseuse pour les cellules B) et une tolérance périphérique, prenant place principalement dans les organes lymphoïdes secondaires. Idéalement, les clones

autoréactifs sont éliminés dès leur apparition. Ainsi, le premier mécanisme que l'on retrouve consiste en l'élimination des lymphocytes autoréactifs par délétion clonale dans les organes lymphoïdes primaires. Ce phénomène de sélection « négative », qui implique une mort cellulaire par apoptose des lymphocytes autoréactifs concernés, est responsable de la « tolérance centrale ». Bien qu'efficace pour éliminer un clone qui réagit trop fortement à un antigène du soi, certains clones autoréactifs peuvent échapper à cette régulation en raison de l'impossibilité de présenter tous les antigènes du soi lors de la sélection clonale et donc d'identifier les clones potentiellement autoréactifs. Par exemple, il a été démontré que les lymphocytes T sanguin de tous les individus répondent à la protéine basique de la myéline (MBP), un constituant majeur de la myéline cérébrale (Jingwu *et al.*, 1992). La sélection négative ne permet pas d'éliminer ces clones. Il existe donc d'autres mécanismes d'induction de tolérance en périphérie qui permettent de limiter l'activation de lymphocytes autoréactifs.

Le plus simple des mécanismes de tolérance périphérique est certainement celui de l'ignorance lymphocytaire où les lymphocytes ne rencontrent jamais leurs antigènes car ceux-ci sont séquestrés dans des sites anatomiques difficiles d'accès tels que le cerveau, la chambre antérieure de l'œil et les testicules. Ces sites sont désignés comme étant immuno-privilegiés en raison de la possibilité d'y effectuer une allogreffe ou une xélogreffe sans pour autant qu'il y ait un rejet du receveur. Il avait été alors suggéré que le système immunitaire n'avait pas accès à ces sites (Barker and Billingham, 1977). Pour appuyer cette hypothèse, il a été démontré que le SNC est protégé des constituants du sang par une barrière physique nommée la barrière hémato-encéphalique (BHE). Cependant, des études ont démontré par la suite que des lymphocytes T étaient en mesure de traverser cette barrière et de pénétrer dans le cerveau, mais sans que ces cellules puissent être activés (Brabb *et al.*, 2000; Yednock *et al.*, 1992). L'absence d'activation des lymphocytes T retrouvés dans le cerveau s'explique par la faible présence de CPAs ainsi que par l'absence de vaisseaux lymphatiques (Barker and Billingham, 1977; Hart and Fabre, 1981; Wong *et al.*, 1984). Quant aux autres sites, il a été démontré que les testicules et la chambre

antérieure de l'œil exprimaient de manière constitutive Fas-L, une molécule qui initie la mort programmée par apoptose des cellules exprimant le récepteur Fas. Ainsi, la plupart des cellules activées tentant de rentrer dans ces sites meurent par apoptose (Griffith *et al.*, 1995). Bien que limiter l'accès des lymphocytes à certains sites anatomiques constitue un mécanisme efficace pour contrer d'éventuelles maladies auto-immunitaire, il existe toujours la possibilité que même si l'antigène est séquestré dans ce sites immuno-priviliés, une ressemblance moléculaire suffisamment élevée avec une protéine d'un agent infectieux puisse induire une réponse immunitaire contre l'antigène du soi (Voehringer *et al.*, 2000). C'est le concept du « *molecular mimicry* » (Voehringer *et al.*, 2000).

La tolérance périphérique s'explique aussi par le phénomène d'anergie clonale, qui se caractérise par l'inactivation fonctionnelle des lymphocytes : les lymphocytes deviennent inaptes à répondre à une stimulation par un antigène. Ce phénomène apparait lorsque les TCR ou BCR sont mises en présence d'un antigène en absence de molécule de costimulation. Ainsi, il en résulte une inactivation à long-terme de ces lymphocytes (Harding *et al.*, 1992).

Un autre mécanisme menant à la tolérance vis-à-vis un antigène du soi est celui de la mort induite par activation (AICD). En effet, comme il est difficile d'éliminer un antigène du soi, un lymphocyte constamment stimulé va finir par mourir, et ce probablement par un attachement entre les molécules Fas-FasL, puisque les cellules activées augmentent leur niveau d'expression de Fas, ce qui les rend susceptible a l'apoptose par cette voie (Sobel *et al.*, 1993; Suda *et al.*, 1993; Watanabe-Fukunaga *et al.*, 1992).

Finalement, comme il a été mentionné précédemment, les lymphocytes Tregs limitent l'activation des autres populations lymphocytaires, peu importe le contexte. Il a été démontré dans les souris que les mutations du gène Foxp3 menaient à une prolifération non-contrôlée des lymphocytes contre des antigènes du soi, et à la mort des souris en 3-4 semaines (Brunkow *et al.*, 2001; Godfrey *et al.*, 1991). L'étude de ce modèle a permis de

mettre en évidence le rôle essentiel de Foxp3 dans l'orientation et le développement thymique des cellules Tregs (Yagi *et al.*, 2004). De manière similaire chez l'Homme, des mutations au gène Foxp3 sont responsables de troubles autoimmuns et allergiques, tel que l'IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome).

Les maladies auto-immunes représentent l'expression pathologique du phénomène d'auto-immunité. Il est légitime de penser que des défaillances au niveau des différents mécanismes d'induction de tolérance centrale et/ou périphérique conduisent à l'émergence de lymphocytes T et B autoréactifs dominants et donc, à la possibilité de développer des manifestations auto-immunes. La plupart des maladies auto-immunes sont des maladies multifactorielles qui résultent de l'action conjointe de facteurs génétiques et environnementaux. Les maladies auto-immunitaires sont fréquentes puisqu'elles affectent 5 à 7% de la population (Sinha *et al.*, 1990). On en connaît plus de 40 et quasiment tous les organes peuvent être touchés. On définit une maladie auto-immune à l'aide de critères directs, indirects ou circonstanciels (Rose and Bona, 1993). Un critère direct nécessite une transmission directe de la maladie d'un humain à un autre humain ou d'un humain à un animal. Actuellement, il a été uniquement possible de démontrer la transmissibilité d'une maladie auto-immune à l'aide d'auto-anticorps. La transmissibilité par les lymphocytes T n'a pas été encore réalisable. Parmi les maladies dont la transmissibilité directe a été démontrée, on retrouve entre autres la maladie de Graves, le purpura thrombopénique idiopathique et la myasthénie grave. Quant aux critères indirects, il est nécessaire que des modèles animaux développent des maladies ayant des caractéristiques cliniques identiques ou proches de celles observées chez l'homme. La majorité des maladies auto-immunes font parties de cette catégorie, que ce soit la maladie de Crohn, la sclérose en plaques (SEP), l'arthrite rhumatoïde, la thyroïdite d'Hashimoto et bien d'autres. Finalement, le critère circonstanciel provient de données cliniques chez l'homme ou chez l'animal soulignant le caractère auto-immun d'une maladie sans apporter la preuve, comme par exemple la détection d'auto-anticorps.

2. La sclérose en plaques

2.1 Généralités

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire chronique auto-immune touchant le SNC, c'est-à-dire le cerveau ainsi que la moelle épinière. Elle affecte environ 2.5 millions de personnes dans le monde et en moyenne 120 personnes pour 100 000 habitants sont nouvellement diagnostiquées chaque année (Compston and Coles, 2002). 70% des patients ont entre 20 et 40 ans. La prévalence de la maladie dans la population générale est variable en fonction des régions du monde étudiées, avec 60-200 patients atteints de SEP pour 100 000 personnes en Europe et en Amérique du nord, alors que dans les zones de faible prévalence comme le Japon, la prévalence est environ 10 fois moins importante. Le Canada possède l'un des taux les plus élevés de SEP au monde. On estime à 65 000 personnes le nombre de Canadiens souffrant de cette maladie. La SEP affecte particulièrement les caucasiens, et très rarement les africains ou les asiatiques. De façon similaire aux autres maladies auto-immunes humaines, les femmes sont plus fréquemment touchées que les hommes, avec un ratio homme : femme de 1 : 3. De plus, plusieurs études à travers le monde suggèrent que, durant les 50 dernières années, l'incidence de la maladie a augmenté (Barnett *et al.*, 2003), et que cette augmentation est plus rapide chez les femmes que chez les hommes, modifiant encore plus le ratio homme : femme (Alonso and Hernan, 2008; Orton *et al.*, 2006).

Des études sur des familles ont dévoilé que les risques de développer la SEP étaient accrus si l'un des membres de la famille était atteint de la maladie (Dyment *et al.*, 2004). Ainsi les risques augmentent de 20-50 fois (2 à 5%) pour une personne apparenté au premier degré (5% pour les frères et sœurs, 2% pour les parents et 2% pour les enfants), alors que pour des jumeaux monozygote, lorsqu'un des jumeaux est atteint de SEP, les probabilités pour que l'autre jumeau soit aussi atteint de SEP est de 20 à 35%. Ces données démontrent qu'en SEP, il existe des facteurs génétiques, mais aussi environnementaux responsables de l'apparition de la maladie.

2.2 Facteurs génétiques en SEP : implication du CMH de classe II

L'analyse génétique de patients atteints de SEP a démontré la plus forte association entre des allèles du CMH de classe II, en particulier au sein de l'haplotype HLA-DR2 contenant l'allèle HLA-DRB1*1501, et l'apparition de la maladie (Hafler *et al.*, 2007; Lincoln *et al.*, 2005; Ramagopalan *et al.*, 2009; Svejgaard, 2008). Un individu portant cet allèle possède cinq fois plus de chances de développer la SEP qu'un individu qui ne la porte pas (Hafler *et al.*, 2007). L'utilisation du modèle animal de la SEP, l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), démontra l'implication directe de l'haplotype HLA-DR2 dans la susceptibilité à la maladie. En utilisant des souris humanisées exprimant le HLA-DRB1*1501 soit seul, soit en combinaison avec le HLA-DRB5*0101, et possédant des lymphocytes spécifiques d'une protéine de la myéline (la protéine MBP), il a été démontré que les animaux exprimant seulement l'allèle HLA-DRB1*1501 développaient une maladie spontanée très sévère (Gregersen *et al.*, 2006). Par contre, l'ajout de l'allèle HLA-DRB5*0101 en combinaison avec l'allèle HLA-DRB1*1501 diminuait à la fois l'incidence et la sévérité de la maladie. Ces données confirment les résultats d'association obtenus chez l'homme.

Bien qu'il n'existe aucun autre allèle avec un risque aussi élevé de développer la maladie que l'allèle HLA-DRB5*0101 (5 fois plus de chance de développer la SEP), il y a des études qui ont démontré un facteur de risque entre un allèle du CMH de classe I et la SEP. En effet, un individu portant l'allèle HLA-A*0301 possède 1.9 fois plus de chance de développer la SEP qu'un individu qui ne le porte pas (Fogdell-Hahn *et al.*, 2000; Harbo *et al.*, 2004). De manière intéressante, il y a aussi deux autres allèles de CMH de classe I qui confèrent une protection vis-à-vis la maladie. Les allèles HLA-A*0201 ainsi que HLA-C*05 sont associés avec un risque inférieur à la normale en ce qui a trait au risque de développer la SEP (Brynedal *et al.*, 2007; Yeo *et al.*, 2007).

Il existe également d'autres allèles, qui ne sont pas reliés au CMH, qui augmentent les risques de développer la SEP, mais dont l'association avec la maladie est faible (aucun

au-dessus de 1.4). La plupart de ces allèles codent pour des protéines liées à la réponse des lymphocytes T, tels que le récepteur à l'IL-7, le récepteur à l'IL-2 (Hafler *et al.*, 2007; Lundmark *et al.*, 2007), le récepteur au TNF, CD6 (De Jager *et al.*, 2009) et la tyrosine kinase-2 qui est importante pour la transmission des signaux permettant la production d'IFNs, IL-10 et IL-12 (Ban *et al.*, 2009).

2.3 Facteurs environnementaux de la SEP

En ce qui a trait à la contribution des facteurs environnementaux à la SEP, cela se vérifie par exemple en étudiant les migrations de populations entre des zones de prévalences inégales. Il a été démontré que les personnes qui migrent après l'âge de 15 ans ont le risque de la région d'origine, alors que ceux qui migrent avant l'âge de 15 ans ont le risque de la région d'arrivée. Pour prendre un exemple concret, des études réalisées sur l'immigration au Royaume-Uni montrèrent que les immigrants pakistanais (zone de faible risque) qui arrivaient avant l'âge de 15 ans avaient significativement plus de risque de développer une SEP que les individus arrivant après l'âge de 15 ans (Dean and Elian, 1997). Et les enfants nés au Royaume-Uni de cette première génération d'immigrants avaient un risque de SEP du même ordre que la population générale du Royaume-Uni peu importe si les parents avaient immigré avant ou après l'âge de 15 ans (Elian *et al.*, 1990). Et puisqu'il est question de zones de prévalence, il est désormais admis que la SEP est plus fréquente dans les pays situés à distance de l'équateur (Kurtzke, 2000). Ainsi l'hypothèse selon laquelle l'exposition lumineuse est un facteur de protection à la SEP fut émise. Une étude montra que l'intensité lumineuse d'une zone était inversement corrélée avec la prévalence de la SEP dans cette même zone (van der Mei *et al.*, 2001). Dans le but de comprendre ce phénomène, des chercheurs se sont penchés sur le rôle de la vitamine D en SEP puisque la synthèse de cette vitamine est directement liée à l'ensoleillement. Il a été démontré qu'il existe une corrélation inverse entre le taux sanguin de vitamine D et le risque de développer la SEP (Munger *et al.*, 2006). Il est à noter cependant que cette

corrélation n'a été retrouvée que chez les caucasiens. Chez l'animal, dans le modèle EAE, l'injection intrapéritonéale (i.p.) quotidienne de la forme active de la vitamine D (Muthian *et al.*, 2006) ou la complémentation de l'alimentation en vitamine D (Spach *et al.*, 2006) permettent de diminuer significativement les signes cliniques de la maladie. De plus, des études ont montré que la vitamine D permettrait d'orienter la réponse immunitaire vers une réponse anti-inflammatoire (Boonstra *et al.*, 2001; Muthian *et al.*, 2006). Il a été démontré également que la vitamine D pouvait induire la formation de Tregs (Dong *et al.*, 2003).

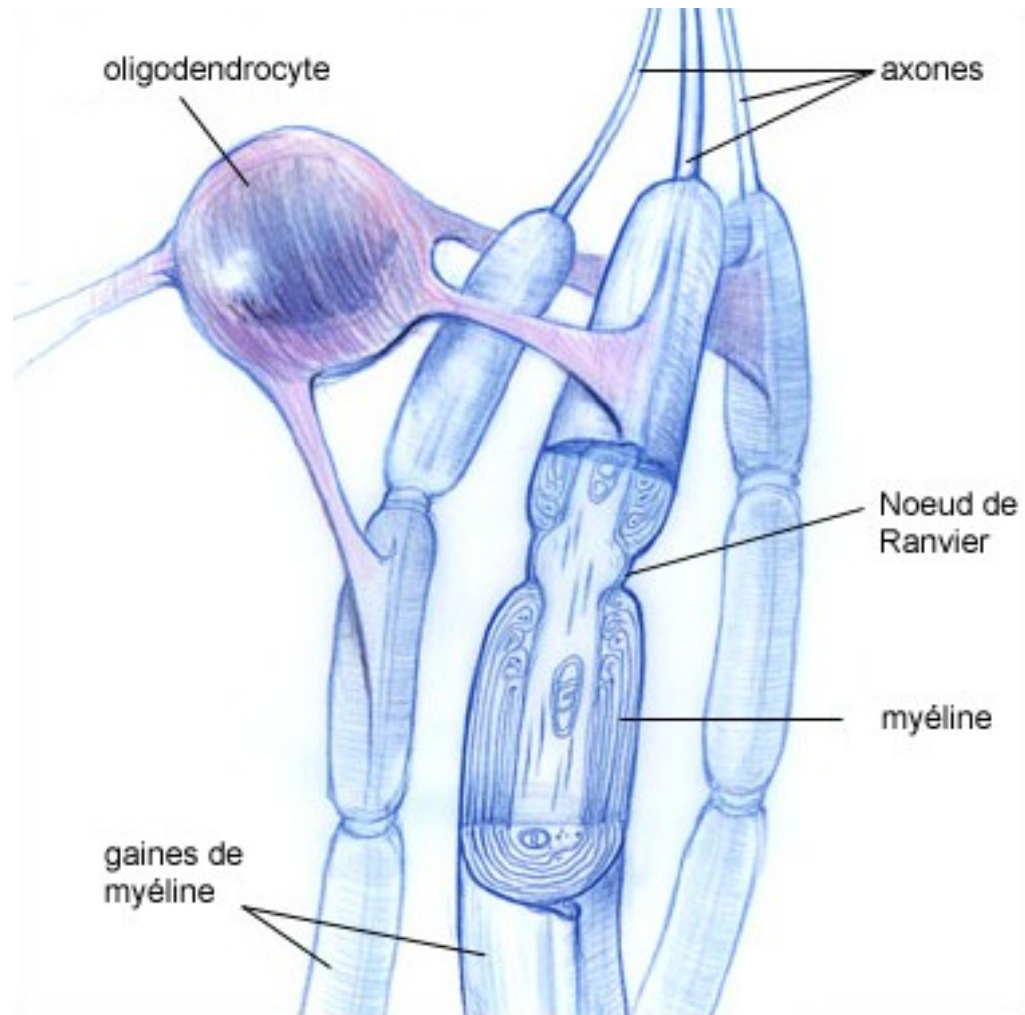
Aussi, le fait que les femmes soient plus atteintes par cette maladie que les hommes suggère un rôle des hormones dans le développement de la SEP. Ceci est supporté par les données sur les femmes enceintes dont le nombre moyen de poussées annuelles diminue progressivement durant les 3 trimestres de grossesse (passant de 0.7 avant la grossesse, à 0.6, puis 0.5 et enfin 0.2 aux 1er, 2ème et 3ème trimestres, respectivement). Puis, rapidement après l'accouchement, le nombre moyen de poussées annuelles augmente fortement (taux annuel moyen de 1.2) pour retrouver progressivement une valeur normale un an après l'accouchement (Confavreux *et al.*, 1998). Des études en EAE ont démontré que l'administration d'estriol, une hormone produite par le placenta lors de grossesse, permettait d'améliorer les signes cliniques de la maladie, et ce probablement par l'induction d'une réponse anti-inflammatoire (Bebo *et al.*, 2001; Correale *et al.*, 1998; Gilmore *et al.*, 1997; Jansson *et al.*, 1994; Kim *et al.*, 1999). Cette observation a été confirmée chez des patientes SEP où l'administration orale d'estriol a permis de diminuer significativement le nombre de lésions ainsi que le volume des lésions mesurés par imagerie par résonance magnétique (IRM) (Sicotte *et al.*, 2002). Toujours du côté hormonal, des symptômes plus sévères de SEP lors des périodes de menstruations ont été relevés. En plus, en EAE, on retrouve une susceptibilité plus élevée à développer la maladie chez les femelles que chez les mâles, et ceci probablement en raison de l'effet protecteur de la testostérone. Effectivement, il a été démontré que les souris mâles castrées développaient une forme plus sévère d'EAE tout en ayant un niveau de testostérone significativement moins élevé en

comparaison aux mâles contrôles (Bebo *et al.*, 1998). Par contre, l'ablation des ovaires chez les femelles n'affectait pas le développement de la maladie.

2.4 Critères de diagnostic de la SEP

Les études en pathologie sur des coupes de cerveaux de patients atteints de SEP démontrent d'importants infiltrats de cellules immunitaires (Sospedra and Martin, 2005). Après de multiples hypothèses, il est désormais admis que la SEP est une maladie inflammatoire du SNC, probablement auto-immune, c'est-à-dire que le système immunitaire du malade s'active et attaque la myéline du SNC pour des raisons encore mal connues. La myéline du SNC est une membrane biologique, le prolongement cytoplasmique des oligodendrocytes, cellule résidente gliale du SNC. La myéline s'enroule autour des neurones pour isoler et protéger les fibres nerveuses (Figure 2). En plus, la myéline permet d'augmenter la vitesse de propagation de l'influx nerveux le long des neurones.

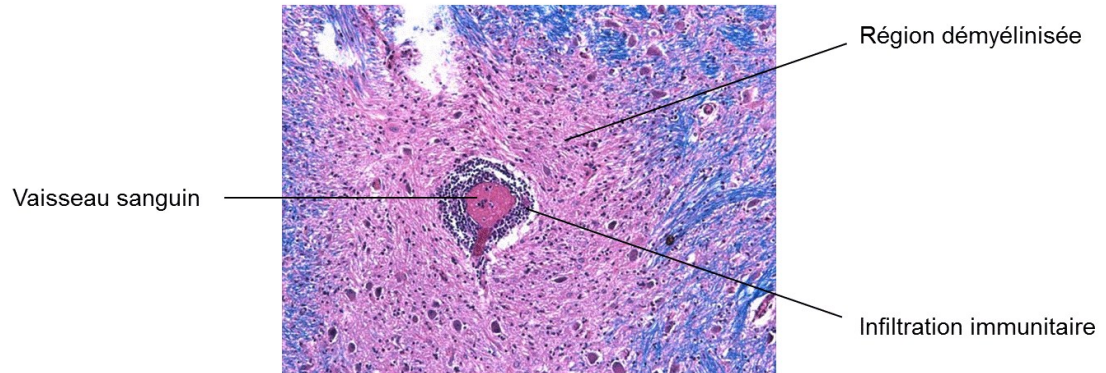
En SEP, les gaines de myéline du SNC sont altérées, ce qui perturbe ou empêche la propagation de l'activité électrique normale le long des axones. On appelle ce processus la démyélinisation. La maladie se manifeste par des poussées inflammatoires qui entraînent donc la démyélinisation (Figure 3). Chez la majorité des patients, les manifestations cliniques sont caractérisées par une altération du système nerveux moteur, sensoriel, visuel et autonome. Par ailleurs, il existe d'autres symptômes ou signes moins perceptibles (dépression, fatigue, etc...) et qui ne seront diagnostiqués que de manière rétrospective (Compston and Coles, 2002).



Adapté du site internet : <http://thebrain.mcgill.ca/>

Figure 2: Recouvrement des axones du système nerveux central par la myéline d'oligodendrocyte.

La principale fonction des oligodendrocytes est de soutenir les axones du SNC en produisant des gaines de myéline qui isolent les axones. La myéline est constituée à 80% de lipides et 20% de protéines, ce qui permet la transmission de l'information de long de l'axone. Comme il est illustré, un oligodendrocyte peut former des gaines de myélines pour plusieurs axones.



Don du tissu par le Dr. Berthelet et marqué par le groupe du Dr. Alexandre Prat

Figure 3: Région démyélinisée d'une section de cerveau d'un patient atteint de sclérose en plaques.

Coloration au luxol fast bleu et à l'hématoxyline-éosine effectuée sur une section de cerveau d'un patient SEP montre une région démyélinisée (en rose) étendue autour d'un vaisseau où l'on peut observer un important infiltrat de cellules. À l'écart du vaisseau, on peut observer la présence de région myélinisée (en bleu).

Les lésions (ou plaques) caractéristiques de la SEP ont été décrites pour la première fois en 1868 par le docteur Jean-Martin Charcot qui baptisa la maladie sclérose en plaques en raison des plaques de démyélinisation (Charcot, 1868a; Charcot, 1868b). Le Dr. Charcot avait associé ces lésions à trois signes cliniques: la dysarthrie (trouble d'articulation), l'ataxie (troubles d'équilibre) et des tremblements. Ces signes cliniques sont encore aujourd'hui intimement associés à la SEP. Ce n'est qu'un siècle plus tard que le terme « poussée » en SEP a été défini comme étant des signes cliniques associés à une perte de myéline localisée dans la matière blanche, et dont l'effet doit perdurer durant au moins 24 heures tout en étant précédé d'au moins 30 jours de stabilité clinique (Schumacker *et al.*, 1965).

Cette définition d'une poussée en SEP a été depuis modifiée, en y ajoutant la possibilité de lésions au niveau de la matière grise. En effet, la substance grise du SNC peut elle aussi être affectée au cours de la maladie, comme cela est visible en IRM par une diminution du volume total de la matière grise (Sanfilippo *et al.*, 2006) et par la présence de lésions (Bo *et al.*, 2003). Par ailleurs, les 30 jours d'intervalle de stabilité clinique entre les poussées furent arbitrairement choisis, mais cet intervalle de temps demeure encore aujourd'hui dans la définition d'une poussée.

La SEP est une maladie cliniquement hétérogène, dont le diagnostic reste un diagnostic de probabilité. Des critères diagnostics consensuels ont été établis au tournant du dernier siècle et sont basés sur une évaluation clinique et des examens complémentaires, pour permettre de classer les patients en trois catégories: SEP certaine, SEP possible et non SEP (McDonald *et al.*, 2001). Le diagnostic repose sur la mise en évidence de symptômes attribuables à des atteintes de plusieurs zones distinctes du SNC (dissémination spatiale) et d'au moins deux poussées (ou d'une progression d'emblée sur plus d'un an) dans le temps (dissémination temporelle), après avoir formellement exclu les autres diagnostics différentiels (Tableau I). Sur le plan pratique, l'IRM et les bandes oligoclonales dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) permettent de confirmer la dissémination dans le temps et dans l'espace. Dans 90% des cas de SEP, l'électrophorèse des protéines contenues

dans le LCR révèle un profil de bandes oligoclonales d'immunoglobulines d'isotype G (IgG) (Figure 4). La présence de ces bandes oligoclonales d'IgG dans le LCR combiné avec l'absence dans le sérum de ces mêmes bandes chez le patient indique une production locale d'immunoglobulines ce qui suppose la présence de lésions immunes et inflammatoires dans le SNC (Cross *et al.*, 2001; Obermeier *et al.*, 2008). Cette pratique fait partie du diagnostic courant de la SEP car il permet d'éliminer les pathologies aux symptômes proches de la SEP (lupus et autres maladies auto-immunes systémiques).

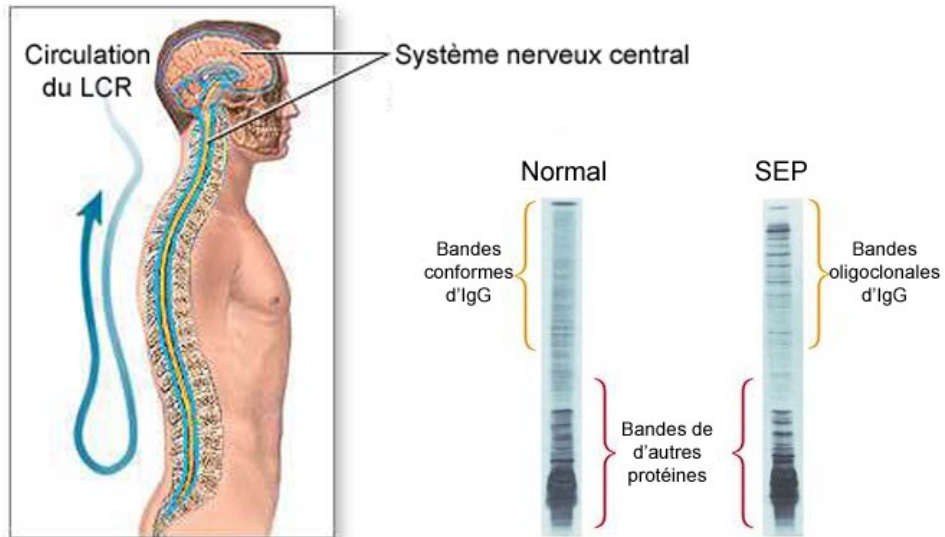
2.5 Les différentes formes de SEP

Il existe deux formes cliniques majeures de SEP: les SEP à forme cyclique ou rémittente-récurrente (RR-MS) et les SEP progressives primaires (PP-MS) (Figure 5). Ces deux formes présentent des différences importantes autant sur le plan radiologique (McFarland, 1999; Rovaris *et al.*, 2003), histologique (Lucchinetti *et al.*, 2000) et clinique (Sospedra and Martin, 2005). Dans environ 85% des cas, la maladie débute par une forme RR-MS. La forme RR-MS se caractérise par des poussées qui généralement perdurent dans le temps (entre une semaine et un mois). Ces poussées sont associées avec l'apparition de lésions inflammatoires dans le SNC, visibles en IRM. Au début de l'évolution de la RR-MS, la majorité des patients récupèrent complètement de leurs poussées. On assiste alors à une alternance dans le temps de poussées suivies de périodes de récupération plus ou moins longues. Puis avec le temps, les poussées deviennent plus fréquentes et le patient commence à ne récupérer que partiellement de son handicap ce qui conduit à l'accumulation de dommages neurologiques (Lublin and Reingold, 1996; Thompson *et al.*, 1990). Et dans la majorité des cas, les patients entrent dans une nouvelle phase de la maladie, appelée SEP progressive secondaire (SP-MS). A ce stade, la maladie n'évolue plus par poussées, et le handicap progresse de manière continue.

Tableau I: Critères de diagnostics de la sclérose en plaques.

Critères diagnostiques de la sclérose en plaques (critères de Mc Donald révisés, 2005 ^{6,7})		
Poussées	Examen clinique	Eléments complémentaires requis pour le diagnostic
≥ 2	≥ 2 lésions	Aucun ; exclusion formelle d'autres pathologies par le neurologue
≥ 2	1 lésion	Dissémination spatiale à l'IRM <i>ou</i> Analyse du liquide céphalo-rachidien positive & ≥ 2 lésions à l'IRM <i>ou</i> Attente d'une nouvelle poussée clinique dans un site différent
1	≥ 2 lésions	Dissémination temporelle à l'IRM <i>ou</i> 2 ^{ème} poussée clinique
1	1 lésion	Dissémination spatiale à l'IRM <i>ou</i> Analyse du liquide céphalo-rachidien positive & ≥ 2 lésions à l'IRM <i>ET</i> Dissémination temporelle à l'IRM ou 2 ^{ème} poussée clinique
0 (progression insidieuse dès le début)	≥ 1 lésion	Progression constante sur 1 an (établie de manière rétrospective ou prospective) <i>ET</i> 2 des 3 critères suivants : - IRM cérébrale positive (9 lésions T2 ou ≥ 4 lésions T2 avec potentiels évoqués visuels positifs) - IRM médullaire positive (≥ 2 lésions focales T2) - Analyse du liquide céphalo-rachidien positive
Mise en évidence d'une dissémination spatiale au moyen de l'IRM		Mise en évidence d'une dissémination temporelle au moyen de l'IRM
3 ou 4 des critères suivants : <ul style="list-style-type: none"> • 1 lésion Gd+ (cérébrale ou médullaire) <i>ou</i> 9 lésions T2 hyperintenses, en l'absence de lésion Gd+ • ≥ 1 lésion infratentorielle ou médullaire • ≥ 1 lésion juxta-corticale • ≥ 3 lésions périventriculaires Remarque : Les lésions médullaires peuvent être comptabilisées avec les lésions cérébrales pour atteindre le nombre nécessaire de lésions T2.		<ul style="list-style-type: none"> • Lésion Gd+, dont la localisation diffère du site de la poussée, visible à l'IRM réalisée ≥ 3 mois après la 1^{ère} poussée clinique <i>ou</i> • Détection d'une nouvelle lésion T2 à un temps quelconque ; comparaison avec une IRM de référence réalisée au moins 30 jours après la 1^{ère} poussée clinique
Définition d'une analyse du liquide céphalo-rachidien positive		Définition d'un examen des potentiels évoqués visuels positif
Présence de bandes oligoclonales d'IgG dans le liquide céphalo-rachidien <i>ou</i> index IgG augmenté		Potentiels évoqués visuels retardés, avec toutefois une onde P100 bien reconnaissable

Adapté de Gobbi et al., Neurology.ch, 2010



Tiré des sites internet suivant: <http://www.boadas.co.cc> et <http://www.mstrust.org.uk>

Figure 4: Présence de bandes oligoclonales d'IgG dans le liquide céphalo-rachidien de patients atteints de sclérose en plaques.

Le LCR entoure le cerveau et la moelle épinière et la présence de bandes oligoclonales d'IgG permet de confirmer un diagnostic de SEP.

Dans 15% des cas, la maladie débute par la forme PP-MS qui est caractérisée par une accumulation permanente des déficits neurologiques dès l'apparition des symptômes sans poussée ni rémission et l'invalidité augmente au cours du temps. Les patients atteints de cette forme présentent des particularités cliniques, notamment un âge moyen d'apparition de la maladie plus avancé (environ 40 ans comparés à 30 ans pour les formes rémittentes) et un ratio homme : femme de 1 : 1 (Cottrell *et al.*, 1999). De plus, les études en IRM dévoilent un nombre des lésions moins important pour les patients atteints de la forme PP-MS, ainsi qu'une moins bonne disposition à développer des nouvelles lésions.

Également, les patients atteints de PP-MS auront plus fréquemment une atteinte de la moelle épinière même si une atteinte du cerveau peut également être observée.

Le temps moyen entre le diagnostic de SEP et le décès du patient est de 30 années environ, avec une réduction de l'espérance de vie de 5 à 10 ans (Bronnum-Hansen *et al.*, 2004). Les patients souffrant de SEP ont aussi un risque accru de suicide, reflétant une augmentation des périodes de dépression au cours de leur vie, et expliquant aussi en partie la réduction de l'espérance de vie observée (Minden and Schiffer, 1990).

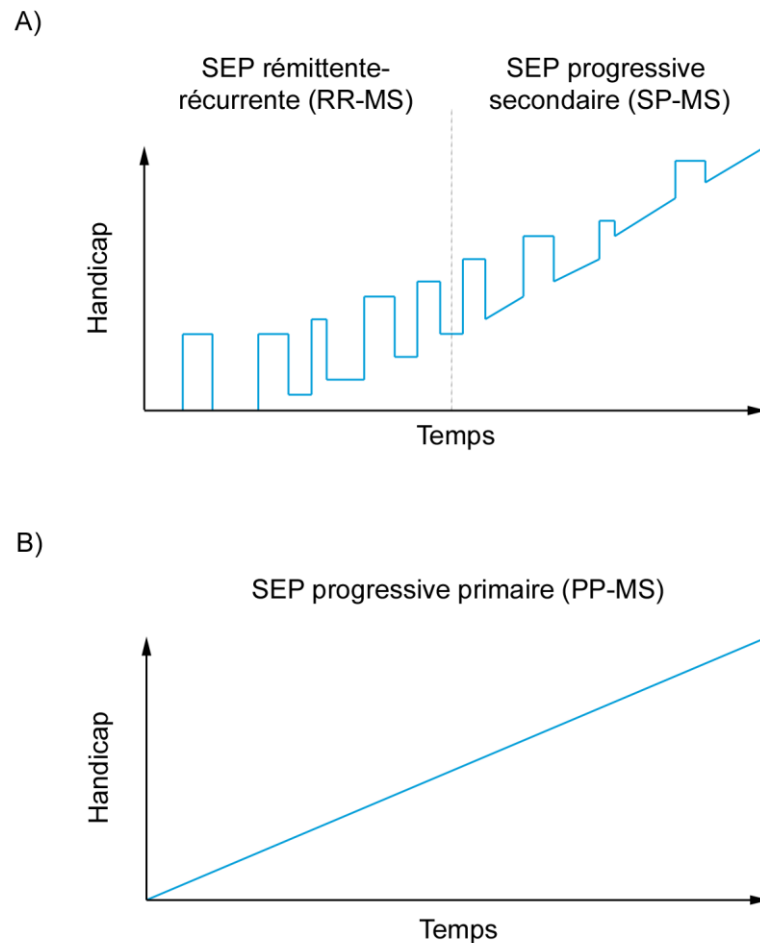


Figure 5: Schéma représentatif de la progression de la sclérose en plaques.

A) Les patients atteints de RR-MS subissent de nombreuses poussées inflammatoires au sein du SNC qui mènent à un certain handicap (moteur, visuel ou sensoriel). Ces poussées sont suivies de périodes d'apaisements. Dans la majorité des cas, les patients atteints de RR-MS vont entrer dans la phase SP-MS durant laquelle la maladie évolue indépendamment des poussées. **B)** Les patients atteints de PP-MS présentent des symptômes sans l'apparition de poussées.

2.6 Agents infectieux : responsables de la SEP?

On comprend mal ce qui initie les cellules immunitaires à attaquer la myéline du SNC. Une infection bactérienne et /ou virale pourrait être à l'origine de ce phénomène. Ce qui appuie cette hypothèse, c'est qu'il a été observé qu'en général les poussées en SEP étaient associées avec des infections communes, telles que l'influenza ou une gastro-entérique. Il n'est donc pas impossible qu'une infection déclenche la maladie. Plusieurs suppositions quant au pathogène responsable de la maladie ont été émises, mais deux infections particulières retiennent l'attention: celle au virus d'Epstein-Bar (EBV) et celle au virus herpétique humain 6 (HHV-6). Dans les deux cas, ce sont des infections qui peuvent causer des encéphalites et qui sont très largement répandues, à plus de 80% de la population mondiale. Mais malgré cela, si on compare des patients SEP à des personnes témoins, on retrouve des différences entre les deux groupes. Presque 100% des patients SEP sont infectés par le EBV comparativement à 90% des personnes saines (Ascherio and Munger, 2007). Cette différence est encore plus marquée chez les enfants, alors que 99% des enfants atteints de SEP sont séropositifs à EBV contre 72% des enfants témoins (Pohl *et al.*, 2006). Il n'y a aucun moyen de se débarrasser d'une infection à EBV, le plus souvent le virus demeurant dans un état dormant à l'intérieur des lymphocytes B, cellules cibles de son infection. Les patients atteints de SEP ont plus souvent tendance à réactiver le virus que les autres personnes de la population, et cette réactivation est associée avec des poussées (Wandinger *et al.*, 2000). Dans le cas de HHV-6, c'est un virus capable d'infecter les oligodendrocytes du SNC, d'où l'intérêt pour ce virus (Opsahl and Kennedy, 2005). De plus, on retrouve dans le sérum et le SNC des patients atteints de SEP une quantité plus élevée d'ADN de HHV6 que chez les individus sains. Par ailleurs, la présence de cet ADN viral est augmentée localement au niveau des lésions inflammatoires par rapport à la substance blanche environnante (Cermelli *et al.*, 2003). Cependant, ce virus est aussi capable d'infecter les cellules immunitaires. Comme la nature des cellules infectées par HHV6 au niveau des lésions n'a pas été caractérisée, on ne peut pas exclure que

l'augmentation de l'ADN de HHV6 observée dans le SNC soit le reflet d'un recrutement de cellules inflammatoires au niveau des lésions.

La question qui se pose si l'on admet qu'une infection est à l'origine de la SEP, c'est comment le système immunitaire passe de combattre un agent infectieux à attaquer une protéine du soi? Pour répondre à cette question, deux mécanismes ont été proposés. Le premier suggère qu'un agent infectieux porte une protéine similaire à une partie de la myéline du SNC, et par le fait même, active les clones autoréactifs. On appelle ce principe « mimétisme moléculaire ». Le second mécanisme proposé suggère plutôt que l'agent infectieux crée un environnement inflammatoire propice au niveau du SNC permettant l'entrée de cellules autoréactives présentes en périphérie et qui vont profiter de la présence de cet environnement pour initier leur activation.

2.7 L'EAE : les différents modèles possibles

L'EAE est un modèle qui est utilisé depuis plus de 60 ans dans le but de comprendre l'inflammation cérébrale (Olitsky and Yager, 1949). C'est une maladie qui peut être induite dans de nombreuses espèces animales (rongeurs, lagomorphes, primates, poulets...). Le plus souvent, l'animal de choix est la souris. L'EAE peut-être induit activement dans les animaux susceptibles tel que les souris SJL par une immunisation avec un homogénat de moelle épinière (Brown and McFarlin, 1981), ou avec des protéines complètes faisant partie de la composition de la myéline, telle que la protéine complète de MBP (Fritz *et al.*, 1983), la protéine complète de PLP (protéolipide de la myéline) (Trotter *et al.*, 1987), ou des peptides immunogènes à partir de MBP (MBP₈₉₋₁₀₁), PLP (PLP₁₃₉₋₁₅₁ ou PLP₁₇₈₋₁₉₁) ou de MOG (glycoprotéine de la myéline d'oligodendrocytes; MOG₉₂₋₁₀₆). Dans les souris C57BL/6, seule une immunisation avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ engendre la maladie (Mendel *et al.*, 1995). Cette différence au niveau de peptides immunogènes dans différentes souches de souris s'explique par le fait que chaque souche de souris possède des haplotypes de CMH différents, et il faut donc que l'haplotype de CMH présent permette

une activation des lymphocytes T lorsque les CPAs présentent le peptide. Les modèles les plus communs d'EAE effectués par une immunisation active sont résumés dans la table II (Tableau II). Il est intéressant de noter que les souris SJL développent une maladie par poussées ressemblant à la forme RR-MS, tandis que les souris C57BL/6 développent une maladie chronique progressive. Cependant beaucoup de travaux de recherche en EAE s'effectuent à l'aide des souris C57BL/6 en raison de la plus grande facilité à générer des souris KO et donc d'étudier spécifiquement la contribution d'une molécule en particulier.

Pour augmenter la réponse immunitaire, la protéine (ou le peptide) de myéline est émulsifié avec l'adjuvant complet de Freund (CFA). En plus de l'adjuvant, l'induction de la maladie requiert l'injection de la toxine pertussique (PTX) qui permettrait entre autre d'ouvrir la BHE pour l'entrée des cellules dans le SNC (Linthicum and Frelinger, 1982). Les premiers signes cliniques apparaissent 10 à 15 jours après l'induction de la maladie dans la plupart des modèles d'immunisation active. Ces signes se caractérisent par une flacidité au niveau de la queue, et une paralysie au niveau des membres inférieurs (postérieurs) progressant vers les membres supérieurs (antérieurs). Ces signes sont accompagnés par une perte de poids, bien que l'évaluation clinique de la maladie soit surtout basée sur les capacités motrices de l'animal suivant l'induction de la maladie. La plupart des lésions se retrouvent dans la moelle épinière, mais on retrouve également des lésions au niveau du cerveau.

Tableau II: Principaux modèles d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale induits de manière actif.

Espèces	Souches	Peptide/Protéine de myéline
Souris	C57BL/6	MOG ₃₅₋₅₅
	SJL	MOG complet; MOG ₉₂₋₁₀₆ PLP ₁₀₄₋₁₁₇ ; PLP ₁₃₉₋₁₅₁ ; PLP ₁₇₈₋₁₉₁ MBP complet; MBP ₈₉₋₁₀₁
	ABH	MOG complet; MOG ₁₋₂₂ ; MOG ₄₃₋₅₇ ; MOG ₁₃₄₋₁₄₈ PLP ₅₆₋₇₀ MBP ₂₁₋₃₅
	B10.PL	MOG ₃₅₋₅₅ MBP ₁₋₁₁
	C3H/Hej	PLP complet; PLP ₂₁₅₋₂₃₂
Rat	Lewis	MBP complet; MBP ₂₉₋₈₄ ; MBP ₆₁₋₈₂ ; MBP ₈₀₋₁₀₅ ; MBP ₁₇₀₋₁₈₆
	DA, BN	MOG complet
Primate	Macaque rhesus	MBP complet MOG ₃₄₋₅₆
	Ouistiti	MOG complet; MOG ₁₄₋₃₆

La caractérisation des infiltrats dans le SNC de souris malades démontrent une présence importante de macrophages, DCs, lymphocytes B, lymphocytes T CD8⁺ et de lymphocytes T CD4⁺ avec un phénotype Th1 et Th17 (Goverman, 2009; Stromnes and Goverman, 2006).

Un autre moyen d'induire l'EAE, c'est le transfert de lymphocytes T spécifiques pour un antigène de myéline d'une souris malade à une souris saine. Dans la plupart des cas rapportés dans la littérature, il s'agit de transfert de lymphocytes T CD4⁺ (Ben-Nun *et al.*, 1981), mais deux équipes de recherches ont démontré la possibilité d'effectuer le transfert de la maladie à partir de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour des peptides de myéline (Huseby *et al.*, 2001; Sun *et al.*, 2001). Cependant quelques études ont tenté de reproduire ces données sans succès (Jiang *et al.*, 2003; York *et al.*, 2010b), et donc l'utilisation du transfert de lymphocytes T CD8⁺ dans le but d'induire l'EAE demeure limitée.

Jusqu'à très récemment, il n'existait pas de modèle spontanée d'EAE ou d'animaux présentant des symptômes similaires à la SEP naturellement. Cependant, des manipulations génétiques au niveau du TCR ont permis de développer des modèles dont l'apparition de la maladie se fait sans injection de peptide ou de protéine de myéline. Par exemple, dans les souris SJL dont les lymphocytes T CD4⁺ sont tous spécifiques pour le peptide MOG₉₂₋₁₀₆, ces souris vont développer une maladie spontanément ressemblant à la forme RR-MS dans 60 à 90% des cas (Pollinger *et al.*, 2009). L'intérêt des modèles spontanés en comparaison aux modèles d'immunisation ou de transfert, c'est que malgré le fait qu'il y ait manipulation génétique, ces modèles se rapprochent plus de la réalité humaine où la maladie apparait sans injection de protéines de myéline et de toxine permettant l'ouverture de la BHE.

Finalement un dernier modèle intéressant est celui induit par le virus Theiler appartenant à la famille des picornavirus, notamment responsable de l'induction de la poliomyélite chez l'humain, une inflammation au niveau de la moelle épinière. Dans la souris, l'injection intracérébrale du virus Theiler induit une maladie neurologique qui

évolue en deux phases. Dans les deux premières semaines, une encéphalomyélite est observée. Elle est suivie par une inflammation de la matière blanche du cerveau et par une démyélinisation des neurones du SNC. Dans la première phase, le virus infecte surtout les neurones, mais durant la seconde phase, on retrouve surtout le virus dans les macrophages et les cellules résidentes du cerveau non-neuronale (aussi appelée cellules gliales). La réponse immunitaire, initialement dirigée contre les antigènes viraux, est essentiellement réalisée par les lymphocytes T CD8⁺ qui vont permettre d'éliminer l'infection des neurones par le virus. Cependant cela entraîne la mort de certains neurones, et la relâche de myéline en plus de former un environnement inflammatoire au niveau du SNC. Et dans la seconde phase de la maladie, la réaction immunitaire change de cible pour se diriger contre des peptides de myéline. Les cellules effectrices de cette deuxième phase de réponse immunitaire sont les lymphocytes T CD4⁺. Les souris ainsi infectées développent une maladie similaire à la forme RR-MS, et ce qu'il y a d'intéressant en plus, c'est que chaque poussée correspond à un changement de cible antigénique de la part du système immunitaire. En effet, chaque poussée est associée à un épitope dominant d'une protéine de la myéline (Miller *et al.*, 1997). On appelle ce phénomène « epitope spreading ». Ce phénomène a été également observé dans les modèles utilisant les souris SJL par une immunisation avec le peptide PLP₁₇₈₋₁₉₁ (McMahon *et al.*, 2005) ou MBP₈₄₋₁₀₄ (McRae *et al.*, 1995; Vanderlugt *et al.*, 2000). Il a été démontré que les DCs provenant de la périphérie étaient responsables de ce phénomène, et induisaient une réponse Th17 à chaque changement d'épitope (McMahon *et al.*, 2005). Ce phénomène « d'epitope spreading » pourrait être à la base de l'apparition des poussées en SEP puisque l'on retrouve dans le sang de patients (et de contrôles sains) des lymphocytes T CD4⁺ spécifiques pour différents épitopes de myéline (Allegretta *et al.*, 1990; Kerlero de Rosbo *et al.*, 1997; Sun *et al.*, 1991).

2.8 Mécanismes physiopathologiques de la SEP

Les études effectuées sur les patients SEP et dans les différents modèles d'EAE, les IRMs, et les nouvelles thérapies permettent de préciser les mécanismes physiopathologiques de la maladie. Un consensus existe pour dire que la SEP commence par la formation de lésions inflammatoires dues à l'infiltration de cellules immunitaires et à une rupture de la BHE détectable par la prise de contraste à l'IRM effectuée par l'entremise d'injection de gadolinium en périphérie. Autant en SEP qu'en EAE, la pathogenèse de la maladie est attribuée aux lymphocytes T CD4⁺ présents dans le parenchyme et réagissant à la myéline (Owens and Sriram, 1995; Sospedra and Martin, 2005). Par surcroît, le facteur de risque génétique le plus important se retrouve sur le CMH de classe II, suggérant un rôle crucial des lymphocytes T CD4⁺ dans la pathogenèse de la maladie. Le fruit de plusieurs études nous laisse à penser que les lymphocytes T CD4⁺ autoréactifs spécifiques à certains antigènes du SNC sont activés dans des organes lymphoïdes secondaires par des CPAs, probablement par les DCs. Une fois qu'elles ont quitté les organes lymphoïdes secondaires et passé dans la circulation sanguine périphérique, les cellules T activées adhèrent à des cellules endothéliales de la BHE et migrent dans le SNC. Après leur migration à travers la BHE, elles sont une nouvelle fois activées par des CPAs présents au sein du SNC et passent dans le parenchyme. La réactivation des cellules T entraîne la libération de cytokines inflammatoires, une activation des cellules gliales locales, une dysfonction de la BHE, un recrutement et une activation d'autres cellules inflammatoires, notamment des macrophages, au siège de l'inflammation. En plus des lymphocytes T CD4⁺, on retrouve régulièrement dans les lésions de SEP et d'EAE des macrophages, des DCs, des lymphocytes T CD8⁺ et des lymphocytes B. On observe également une activation des cellules résidentes du SNC, notamment les microglies et les astrocytes (Lassmann *et al.*, 2007; McFarland and Martin, 2007; Rodriguez, 2007).

2.8.1 Les lymphocytes T CD4⁺ et la SEP

Il ne fait aucun doute que les lymphocytes T CD4⁺ jouent un rôle déterminant en SEP, que ce soit en raison du facteur de risque avec le CMH de classe II, des différents modèles de EAE principalement tous médiés par les lymphocytes T CD4⁺, l'induction de l'EAE via le transfert de lymphocytes T CD4⁺ ou des clones autoréactifs retrouvés dans le sang de patients (bien que présents également dans les contrôles). Il est donc logique que la majeure partie des recherches en SEP se soient concentrées autour des lymphocytes T CD4⁺. Bien que les Th1 ont longtemps été considérés comme les cellules induisant la maladie, de nombreuses études en EAE ont suggérées que les lymphocytes sécrétant de l'IL-17, donc les Th17, seraient responsables de l'initiation de la maladie et de la formation de lésions (Chen *et al.*, 2006; Cua *et al.*, 2003; Komiyama *et al.*, 2006; Langrish *et al.*, 2005). Cela a été démontré par manipulation génétique sur l'IL-23 dans les souris. En effet l'IL-23, qui sécrétée par les CPAs, est nécessaire à la génération des lymphocytes Th17. C'est une cytokine composée de deux protéines, p19 et p40. La sous-unité p40 peut s'associer avec la sous-unité p35 pour former l'IL-12 nécessaire à la formation de Th1 alors que la sous-unité p19 est spécifique à l'IL-23 et donc aux lymphocytes Th17. Ainsi, les souris IL-23p19KO sont incapables de développer l'EAE, alors que les souris IL-12p35KO sont susceptibles à l'initiation de la maladie (Cua *et al.*, 2003). Bien entendu, les souris IL-12p40KO sont également incapables de développer la maladie. Mais cela ne veut pas dire que les Th1 ne sont pas importants en EAE puisque la sous-unité p35 peut s'associer avec la sous-unité EBI-3 (EBV-induced gene 3) pour former l'IL-35, une cytokine sécrétée par les Tregs qui a des facultés anti-inflammatoires (Collison *et al.*, 2007). Il n'est donc pas impossible que le phénotype observé dans le modèle IL-12p35KO ne reflète pas le fait qu'une induction d'EAE soit possible en absence de Th1, mais reflète plutôt l'absence d'une molécule importante pour l'immunorégulation des lymphocytes T CD4⁺ conduisant ainsi au phénotype observé. De plus, il a été démontré que la sécrétion d'IL-17 ou d'IL-22 par les lymphocytes Th17 pouvait fragiliser la BHE, menant au recrutement de d'autres cellules impliquées dans la réponse inflammatoire. En plus, cette même étude a démontré

que les lymphocytes Th17 pouvaient directement tuer les neurones par la production de granzyme B (Kebir *et al.*, 2007). Cependant, récemment une étude en EAE a démontré qu'autant les lymphocytes Th1 que les Th17 étaient capables d'induire la maladie, mais les animaux malades présentaient des signes cliniques et pathologiques différents. Les lymphocytes Th17 induisent une inflammation plus importante dans le parenchyme alors que les lymphocytes Th1 vont induire une inflammation plus prononcée au niveau de la moelle épinière (Stromnes *et al.*, 2008).

Il est possible que cette dernière observation puisse expliquer les différences observées entre les formes de SEP. Ainsi les patients RR-MS formeraient plus de lymphocytes Th17 que de lymphocytes Th1, alors que les patients PP-MS formeraient plus de lymphocytes Th1 que de lymphocytes Th17. Ceci reste cependant à confirmer, mais l'échec du traitement anti-IFN γ en EAE (Duong *et al.*, 1992) combiné à l'inhibition de l'EAE dans les souris IL-23p19 KO a mené les chercheurs à se concentrer sur les lymphocytes Th17. Aujourd'hui, on pense que les lymphocytes Th17 pourraient être à l'origine d'une panoplie de maladies auto-immunes en plus de la SEP telles que l'arthrite rhumatoïde (van den Berg and Miossec, 2009), le psoriasis (Di Cesare *et al.*, 2009), le diabète auto-immun (Emamallee *et al.*, 2009), le syndrome de Sjogren (Katsifis *et al.*, 2009), le lupus (Crispin and Tsokos, 2010), les maladies inflammatoires chroniques intestinales (telles que la maladie de Crohn et la colite ulcéreuse) (Sarra *et al.*, 2010), et bien d'autres. Ainsi, il est désormais suggéré dans la communauté scientifique qu'un traitement en SEP pourrait passer par l'inhibition de la formation/action des lymphocytes Th17 dans le SNC.

2.8.2 Les lymphocytes T CD8⁺ et la SEP

Plusieurs données contradictoires au sujet du rôle des lymphocytes T CD8⁺ en EAE ne permettent de conclure clairement à un rôle pathologique ou régulateur de ces cellules dans la maladie, ce qui complique la tâche quant à savoir si ces cellules devraient être

ciblées ou non dans le développement de thérapies en SEP. En effet, des souris KO pour la β -2 microglobuline, une composante du CMH de classe I et essentielle pour le développement des lymphocytes T $CD8^+$, montrent des signes cliniques exacerbés par rapport aux contrôles, suggérant ainsi un rôle protecteur de la part des lymphocytes T $CD8^+$ dans ce modèle (Linker *et al.*, 2005). De plus, il a été démontré que les lymphocytes T $CD8^+$ jouaient un rôle régulateur dans de nombreux modèles de EAE en réduisant l'inflammation cérébrale et l'apparition de poussées (Jiang *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 1992; Koh *et al.*, 1992). Deux phénotypes régulateurs de lymphocytes T $CD8^+$ ont été décrits dans le cadre d'études en EAE: $CD8^+ CD28^-$ et $CD8^+ CD122^+$. Il a été démontré que les lymphocytes T $CD8^+ CD28^-$ induisaient un phénotype tolérogénique de la part des DCs en inhibant leur expression de molécules costimulatrices, ce qui avait pour conséquence d'empêcher l'activation des lymphocytes T $CD4^+$ (Najafian *et al.*, 2003). Quant à la population de lymphocytes T $CD8^+ CD122^+$, il a été révélé que ces cellules étaient en mesure de sécréter de l'IL-10, et la déplétion de cette population provoquait une maladie plus sévère dans le modèle d'immunisation active dans les souris C57BL/6. Par contre, le transfert de cette population menait à un effet inverse et améliorait les signes cliniques observés (Lee *et al.*, 2008; Rifa'i *et al.*, 2004). Finalement, un groupe de recherche a dévoilé que le transfert de lymphocytes T $CD8^+$ spécifiques au peptide MOG₃₅₋₅₅ supprimait l'induction d'EAE et pouvait même inhiber un EAE en cours (York *et al.*, 2010b). Le rôle possible des lymphocytes T $CD8^+$ en SEP et EAE est exploré dans le 4^{ème} article présenté dans cette thèse.

Cependant, la plupart de ces modèles présentent un biais puisque l'induction de la maladie favorise une réponse des lymphocytes T $CD4^+$ par les CPAs. Ainsi récemment, plusieurs groupes ont développé des modèles inflammatoires cérébraux induits par les lymphocytes T $CD8^+$ dans les souris. La plupart de ces modèles sont générés à partir d'animaux manipulés génétiquement. A titre, d'exemple, un groupe a induit l'expression de la protéine hémagglutinine du virus influenza (HA) sur des cellules gliales, les oligodendrocytes. L'injection de lymphocytes T $CD8^+$ dont le TCR est spécifique au HA a

conduit à la mort des oligodendrocytes, à des lésions au niveau des nerfs optiques, de la moelle épinière ainsi qu'au cerveau, et à une maladie chronique progressive (Cabarrocas *et al.*, 2003; Saxena *et al.*, 2008).

On retrouve également les modèles d'inflammation cérébrale induit par des infections virales. Il a déjà été question du modèle induit par le virus Theiler, qui est initié par les lymphocytes T CD8⁺ qui sont primordiales pour lutter contre l'infection viral, mais qui semblent jouer un rôle secondaire en ce qui concerne la démyélinisation observée dans ce modèle. Cependant, dans d'autres modèles d'infection virale, ce sont les lymphocytes T CD8⁺ qui vont être responsables de la démyélinisation. En effet, l'injection du virus de l'hépatite murine (MHV) par voie intracérébrale induit l'infection des neurones, oligodendrocytes et astrocytes (Dales, 1995). Dépendamment de la souche et de la charge virale utilisée, il est possible d'induire une encéphalomyélite rapide et fatale (7 jours post-infection) ou une encéphalite chronique caractérisée par l'infiltration de cellules immunitaires au niveau de la moelle épinière et du cerveau (Lane and Buchmeier, 1997). Dans ce dernier cas, le virus est éliminé 7 jours post-infection par une réponse immunitaire dominée par les lymphocytes T CD8⁺ (Bender and Weiss, 2010; Gruslin *et al.*, 2005). Il est intéressant de noter que l'infection intracérébrale dans des souris immunocompromis conduit à la mort des souris 12 jours après l'infection, mais ceux-ci ne présenteront pas de démyélinisation. L'injection en périphérie de cellules de la rate de souris immunocompétentes permet d'éliminer l'infection virale, mais conduit à une démyélinisation (Houtman and Fleming, 1996). Ainsi, aussi bien l'élimination virale que la démyélinisation sont deux phénomènes induits par la réponse immunitaire, ce qui fait de ce modèle un système intéressant à étudier dans le cadre d'une inflammation cérébrale induit par les lymphocytes T CD8⁺.

Du côté humain, les études effectuées sur les coupes de cerveau de patients SEP montrent une présence de lymphocytes T CD8⁺ dans le parenchyme des patients démontrant la capacité de ces cellules à atteindre le SNC. Une analyse des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ retrouvées dans les lésions de patients atteints de SEP a révélé que les TCR

des lymphocytes T CD8⁺ étaient plus homogènes que ceux des lymphocytes T CD4⁺, suggérant que les lymphocytes T CD8⁺ retrouvés dans le SNC étaient le fruit d'une expansion clonale, et fort logiquement à un peptide se retrouvant dans le SNC (Babbe *et al.*, 2000). De plus, les lymphocytes T CD8⁺ ont été retrouvés à proximité d'axones démyélinisés dans les sections de cerveau de patients SEP (Neumann *et al.*, 2002b) et pouvant interagir avec les oligodendrocytes via la liaison NKG2D sur les lymphocytes T CD8⁺ et MICA sur les oligodendrocytes (Saikali *et al.*, 2007b).

Ainsi ces données nous indiquent qu'il est fort possible que les lymphocytes T CD8⁺ jouent un rôle actif dans l'inflammation cérébrale observée chez les patients SEP, avec des sous-populations (CD8⁺ CD28⁻ et CD8⁺ CD122⁺) capables de jouer le rôle de cellules immunorégulatrices. Cependant, à l'heure actuelle, il est impossible de savoir si les lymphocytes T CD8⁺ participent directement à la SEP en ciblant la myéline ou indirectement, en combattant une infection virale dans le SNC entraînant par le fait même des réactions inflammatoires.

2.8.3 Les lymphocytes B et la SEP

Quant aux lymphocytes B en SEP, on sait depuis les 1940 qu'il y a une présence anormale d'immunoglobulines dans le SNC de patients atteints de SEP (Kabat *et al.*, 1948). Mais justement parce qu'il y avait activation des lymphocytes B, les recherches en SEP se sont concentrées sur les lymphocytes T CD4⁺ nécessaires à l'induction de la réponse humorale. Et le fait que l'EAE ne se transfère pas par des anticorps a limité l'intérêt de la recherche sur les lymphocytes B en SEP (Sospedra and Martin, 2005). Néanmoins, la relâche d'auto-anticorps pourrait en théorie participer à la pathogénèse de la SEP en ciblant la destruction de la myéline par les granulocytes ou les cellules de la lignée monocyttaire, c'est-à-dire les monocytes, les macrophages et les DCs. Il y a aussi la possibilité pour les lymphocytes B d'agir comme CPAs dans le SNC puisqu'en théorie, ils en ont la capacité, et qu'on retrouve des lymphocytes B dans les lésions. Ainsi, il serait possible que les

lymphocytes B entrent dans le SNC, activent les lymphocytes T CD4⁺ qui en retour vont induire la maturation des lymphocytes B pour que ceux-ci relâchent des anticorps. Mais encore une fois, ceci reste à être démontré.

Les résultats d'une récente étude indiquent qu'en plus de participer à l'inflammation cérébrale, les lymphocytes B pourraient également avoir un rôle immuno-régulateur. En effet, la déplétion des lymphocytes B 7 jours avant l'induction de l'EAE mène à une maladie plus sévère (Matsushita *et al.*, 2008). Cet effet a été attribué à une sous-population de lymphocytes B capables de sécréter la cytokine IL-10. Chez la souris, ces lymphocytes B sont caractérisés par l'expression des molécules CD1d et CD5, et sont nommés cellules B10 en raison de leur capacité à produire de l'IL-10. De manière intéressante, ce même groupe a effectué la déplétion des lymphocytes B 14 jours après l'induction de la maladie, et a observé une réduction dans la sévérité des signes cliniques suggérant la capacité des lymphocytes B à contribuer à la maladie. Chez l'humain, la production d'IL-10 par des lymphocytes B est attribuée aux cellules naïves, c'est-à-dire présentant le phénotype CD19⁺ CD27⁻ (Duddy *et al.*, 2007). Quant aux lymphocytes B mémoires humaine, une étude a démontré leur capacité à agir en tant que CPA. En effet, il a été observé que les lymphocytes T CD4⁺ isolés du sang de patients RR-MS étaient en mesure de proliférer et de produire de l'IFN- γ lorsque mis en culture en présence de lymphocytes B mémoire (CD19⁺ CD27⁺) ainsi que des protéines MBP ou MOG (Harp *et al.*, 2010). Ainsi, il est envisageable de penser qu'une sous-population de lymphocytes B puissent agir en tant que régulateur de la réponse immunitaire en produisant de l'IL-10 et qu'une autre sous-population de lymphocytes B agissent en tant que CPA et produisent les anticorps caractéristiques de la maladie, contribuant donc à la pathogénèse de la SEP.

2.8.4 Les cellules de la lignée monocyttaire et la SEP

Pour effectuer leurs fonctions, les lymphocytes T ont besoin de CPAs qui leur présenteront les antigènes. Un débat perdure quant à la nature et à l'identité des CPAs qui

sont responsables de la réactivation des lymphocytes T dans le SNC. Plusieurs études ont été mises de l'avant dans le but d'évaluer le rôle des monocytes, des macrophages, des DCs et des microglies.

Les macrophages et les DCs de type myéloïdes proviennent en grande partie de monocytes circulants (Geissmann *et al.*, 2010). Ainsi, en entrant dans un tissu, les monocytes se différencient en l'un de ces deux types de cellules dépendamment de l'environnement (Chomarat *et al.*, 2000; Randolph *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004). Quant aux microglies, qui sont les CPAs résidentes du SNC, elles proviennent du même précurseur que les monocytes et elles auraient migré tôt durant l'embryogénèse (Ginhoux *et al.*, 2010). A l'état physiologique, les microglies expriment peu ou pas de CMH de classe I et de classe II, ainsi que peu ou pas de molécules costimulatrices (CD80, CD86, et CD40) (Aloisi *et al.*, 1998). Suite à un stimulus inflammatoire, les microglies sont en mesure d'augmenter l'expression de ces molécules et peuvent induire la prolifération de lymphocytes T CD4⁺ de lignées Th1 et Th2. Cependant, l'inflammation cause un important problème au niveau de l'étude des microglies puisque ces cellules acquièrent un phénotype pratiquement identique aux macrophages, et il est donc très difficile à savoir si les microglies sont réellement en mesure d'activer les lymphocytes T *in vivo*. Ainsi, dans le but d'étudier la contribution des microglies en EAE, de nombreuses études ont utilisé des techniques d'irradiation combinées avec des chimères de moelle osseuse pour permettre de différencier les microglies des cellules provenant de la périphérie. En utilisant ces techniques, il a été démontré que l'activation des microglies (expression des molécules de CMH et costimulation) précédait l'entrée des macrophages périphériques dans le SNC et était associée avec l'infiltration de lymphocytes T (Ponomarev *et al.*, 2005). Il a également été révélé dans un modèle murin où les microglies exprimaient un gène suicide que l'EAE était significativement moins sévère en absence de microglie, impliquant un rôle pour les microglies dans l'induction et l'évolution de la maladie (Heppner *et al.*, 2005). Cependant, jusqu'à présent aucune étude n'a été en mesure de démontrer que les microglies étaient en mesure de soutenir l'induction de la maladie sans les CPAs périphériques, et il n'est pas

exclu que la contribution des microglies en EAE ne soit pas liée à la présentation d'antigène, mais plutôt à la libération de substances cytotoxiques telles que l'oxyde nitrique, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires et de chimiokines, toutes importantes pour soutenir l'inflammation cérébrale (Tran *et al.*, 1997).

Pour évaluer l'importance des CPAs périphériques en EAE, un groupe de recherche a démontré que l'ablation de l'expression du CMH de classe II par les cellules en périphérie ne permettait aucune induction d'EAE (Greter *et al.*, 2005). Par contre, l'expérience inverse où seules les CPAs en périphérie expriment le CMH de classe II (et où donc microglies sont incapables d'agir comme CPAs) a permis l'induction de la maladie. De plus, le même groupe a démontré que l'induction de l'EAE était possible en ayant comme seuls CPAs fonctionnels dans la souris les DCs en périphérie (Greter *et al.*, 2005). Et récemment, il a été démontré par une technique de parabiose que le blocage du recrutement de monocytes périphériques au sein du SNC réduisait significativement les signes cliniques observés (Ajami *et al.*, 2011). De plus, la déplétion pharmacologique ou chimique des monocytes/macrophages périphérique a réduit significativement la démyélinisation et l'accumulation de lymphocytes dans le SNC en EAE, menant à une importante réduction des signes cliniques chez la souris et le rat (Huitinga *et al.*, 1990; Jung *et al.*, 1993; Tran *et al.*, 1998). Bien que le débat continue de battre son plein, il est permis de penser que la principale activation des lymphocytes T dans le SNC s'effectue via des CPAs provenant de la périphérie, alors que les microglies participent au processus inflammatoire principalement pas la relâche de molécules pro-inflammatoire.

Dû au fait que l'on retrouve autant des clones de lymphocytes T CD4⁺ réagissant à des peptides de myéline dans le sang de patients SEP que chez les personnes saines, et compte tenu du fait que les DCs sont les plus efficaces à induire une réponse de la part de lymphocytes T naïfs, il est pratiquement assuré que des DCs sont en mesure de capturer des débris de myéline, et de les présenter dans les organes lymphoïdes. Ainsi deux questions importantes restent en suspens : l'identification de l'organe lymphoïde où les antigènes du SNC sont transportés puisque le SNC ne comporte aucun vaisseau lymphatique, et l'origine

des DCs transportant les antigènes. Pour répondre à la première question, des chercheurs ont démontré que l'injection d'antigènes marqués dans le parenchyme nerveux ou dans les ventricules cérébraux étaient retrouvés dans les ganglions cervicaux, accessibles via le LCR (Hatterer *et al.*, 2006; Ling *et al.*, 2003). Ainsi, il existe deux possibilités : soit les DCs prennent en charge des débris de myéline directement dans le parenchyme, soit des débris sont drainés jusqu'au LCR où des DCs les capturent. Quant à la seconde question qui est de connaître la provenance de ces DCs, deux hypothèses avaient été émises : suite à une activation, les microglies du SNC se différenciaient en DCs et sortent du parenchyme pour présenter les antigènes aux lymphocytes T en périphérie. Cependant une étude sur les souris utilisant une nouvelle fois la combinaison d'irradiation et de chimères de moelle osseuse révéla que les DCs retrouvées dans le SNC en EAE provenaient toutes de la périphérie puisqu'elles exprimaient un marqueur caractéristique des cellules nouvellement formés (Bailey *et al.*, 2007). Ces données ont été confirmées chez l'humain par une étude parue en 2008. Cette étude a démontré que non seulement les microglies fœtales et adultes étaient incapables de se différencier en DCs, mais qu'en envoyant les mêmes signaux qu'aux monocytes pour permettre leur différenciation en DCs, les microglies adoptaient un phénotype immunorégulateur en augmentant leur sécrétion d'IL-10 et diminuaient par le fait même leur capacité à induire une activation des lymphocytes T CD4⁺ (Lambert *et al.*, 2008). La seconde hypothèse au sujet de la provenance des DCs stipulait que des monocytes de la périphérie étaient entrés dans le SNC et s'étaient différenciés en DCs comme c'est le cas dans tous les autres organes du corps humain (Fabriek *et al.*, 2005; Randolph *et al.*, 1998; Randolph *et al.*, 2002). Cette hypothèse fait l'objet du second article présenté dans cette thèse. De plus, les DCs de la périphérie sont les seules CPAs capables d'induire un profil Th17 dans le SNC de souris EAE, surpassant les macrophages et les microglies (Bailey *et al.*, 2007). La mise en évidence de la présence de DCs (et macrophages) dans le SNC de souris a été démontrée à maintes reprises. Chez l'humain, la présence de DCs a été révélée dans le LCR de patients SEP, spécialement en période de poussées (Pashenkov *et al.*, 2001). De plus, une autre étude utilisant des sections de

cerveaux de patient SEP a démontré la présence de DCs qui étaient associées avec des lymphocytes dans les lésions (Serafini *et al.*, 2006).

Finalement pour ce qui est des macrophages, ces cellules constituent la population que l'on retrouve en plus grand nombre dans les lésions de SEP (Barnett *et al.*, 2006). Bien entendu, les microglies activées participent à ce dénombrement, mais il a été démontré que la majorité des cellules portant un phénotype « macrophages » proviennent de la périphérie (Ajami *et al.*, 2011). Comme pour les microglies, il est admis dans la communauté scientifique que la principale participation des macrophages à la pathogénèse de la SEP réside en leur capacité à produire des facteurs amplifiant l'inflammation cérébrale, tels que des cytokines pro-inflammatoires (IL-1 β , IL-6, TNF,...), des chimiokines (MCP-1, RANTES, IP-10,...) et l'oxyde nitreux (Barnett *et al.*, 2006; Hendriks *et al.*, 2005).

Bien qu'il ne soit pas exclu que d'autres cellules que les DCs soient en mesure de présenter les antigènes de la myéline aux lymphocytes entrant dans le SNC, les DCs demeurent l'option la plus logique à l'heure actuelle. Cela ne signifie pas que les macrophages/microglies ne jouent pas un rôle important dans la maladie puisque l'ablation des microglies conduit à une maladie moins sévère. De manière intéressante, toutes les données actuelles pointent vers les DCs provenant de la périphérie pour induire une réponse de type Th17 par les lymphocytes T CD4⁺ ainsi que pour l'induction du changement d'épitopes associé aux poussées observées dans le modèle RR-MS en souris. Ainsi, les DCs deviennent une cible de choix pour développer de nouveaux outils thérapeutiques.

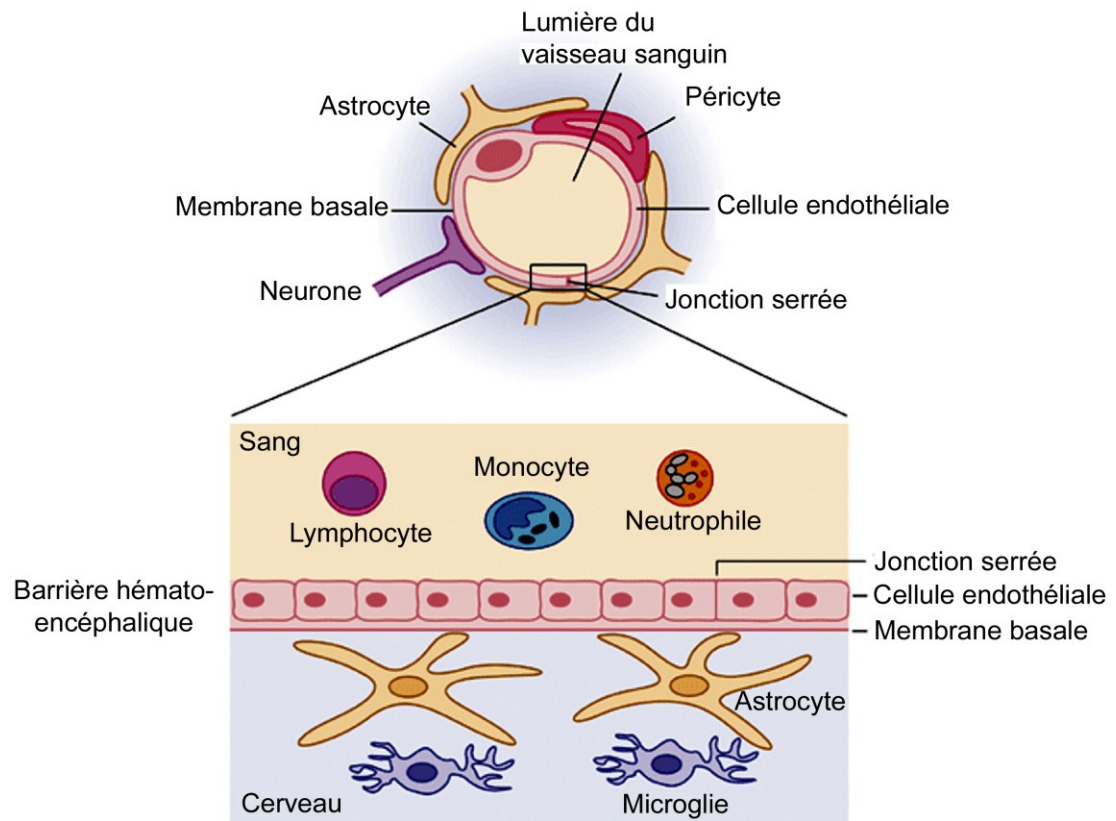
3. Le système nerveux central et la barrière hémato-encéphalique

Ce qui rend la SEP si particulière comme maladie est le site de l'attaque, soit le SNC, un organe qui en temps normal est très bien protégé contre les agressions immunes et dont l'accès est restreint. En effet, le SNC est un organe si important pour l'être humain que les cellules gliales et les neurones qu'il contient sont séparés du sang et du LCR par des barrières qui maintiennent un environnement ionique stable indispensable à l'activité neuronale. Ces barrières permettent ainsi la régulation de l'équilibre ionique, facilitent le transport des nutriments, et limitent l'entrée de molécules et des cellules potentiellement dangereuses (Kim *et al.*, 2006). Les deux principales barrières au niveau du SNC sont: la BHE dont il a déjà été question et la barrière hémato-liquidienne (entre le sang et le LCR) (Abbott, 2004). Alors que la BHE est formée par les cellules endothéliales cérébrales recouvrant les capillaires et micro-vaisseaux du parenchyme, la barrière hémato-liquidienne est formée par les cellules épithéliales des plexus choroïdes recouvrant les capillaires des méninges. Les plexus choroïdes sont des structures contenues dans les ventricules du cerveau et sont responsables de la production du LCR.

3.1 La barrière hémato-encéphalique

L'existence de la BHE a été révélée par Dr. Ehrlich à la fin du 19^{ème} siècle, lorsqu'il décrivit que les tissus cérébraux n'étaient pas colorés suite à l'injection d'un colorant dans la circulation sanguine chez des rats (Ehrlich, 1885; Ehrlich, 1904). Plus tard, Edwin Goldman, un étudiant d'Ehrlich, démontra que l'injection d'un colorant dans le LCR pouvait colorer les tissus du SNC, mais aucun autre tissu (Goldmann, 1913). Ceci suggérait donc la présence d'une barrière entre le sang et le cerveau qui filtre aussi bien l'entrée que la sortie des molécules dans le SNC.

La BHE est localisée anatomiquement à l'interface entre le sang et le tissu cérébral. Elle est composée principalement des cellules endothéliales des capillaires et des microvaisseaux cérébraux connectées entre elles par des jonctions serrées. Les capillaires cérébraux comportent une seule couche de cellules endothéliales, reposant sur une matrice extracellulaire (ou lame basale), entourées d'une couche astrocytaire quasi-ininterrompue formant la « *glia limitans vascularis* » (Goldstein and Betz, 1986). D'autres cellules sont localisées autour des capillaires : les cellules microgliales, et les péricytes (Figure 6) (Ballabh *et al.*, 2004). La BHE maintient l'homéostasie du SNC en le protégeant des toxines et des micro-organismes. D'un autre côté, la BHE peut empêcher les agents thérapeutiques d'arriver en concentration suffisante dans le cerveau puisque plus 98% des molécules ciblant le cerveau sont incapables de passer la BHE, gênant ainsi considérablement le traitement des infections du SNC (Pardridge, 2001). En théorie, la pénétration des molécules dans le SNC pourrait se faire par un passage transcellulaire, c'est-à-dire à travers les cellules endothéliales, ou paracellulaire, soit entre les cellules. Le passage transcellulaire correspond à différents mécanismes comme la diffusion passive de composés lipophiles, l'utilisation de transporteurs spécialisés ou encore la transcytose. Le passage paracellulaire utilise le gradient de concentrations des ions et solutés. Au niveau de la BHE, le passage paracellulaire est quasiment complètement obstrué par la présence d'un réseau de jonctions serrées (JS) entre les cellules endothéliales (Petty and Lo, 2002). Ainsi, le passage des solutés du sang vers le parenchyme nerveux n'est pas absent, mais est très contrôlé : les substances de petite taille liposolubles ou les gaz (O₂ et CO₂) sont en mesure de passer la barrière via leur gradient de concentrations (Grieb *et al.*, 1985). Pour les nutriments tels que le glucose et les acides aminés, ils entrent dans le SNC par des mécanismes de transport actif (passage transcellulaire) en utilisant des transporteurs spécifiques exprimés par les cellules endothéliales (Ballabh *et al.*, 2004).



Adapté de Blasi *et al.*, *Adv Drug Deliv Rev*, 2007

Figure 6: Structure de la barrière hémato-encéphalique.

La BHE est composée de cellules endothéliales du cerveau reliées entre elles par des jonctions serrées. La présence de ces dernières et l'absence de pores font de la BHE une barrière hermétique. L'étanchéité de la BHE est supportée par la membrane basale qui supporte les cellules endothéliales, et par les astrocytes dont les pieds recouvrent entièrement la BHE.

Bien que les cellules endothéliales constituent la barrière physique et métabolique en tant que telle, les interactions avec la matrix extracellulaire ainsi que les astrocytes sont cruciaux pour le bon fonctionnement de la BHE. La BHE peut être rompue dans des conditions bien particulières comme l'hypertension, l'inflammation ou l'hyperthermie. On parle alors de BHE fragilisée ou perméable; ce phénomène facilite le passage des molécules et cellules au SNC comme c'est le cas en SEP. La fragilisation de la BHE est d'ailleurs une caractéristique importante en SEP. Cette fragilisation a d'abord été reconnue dans les années 1960 par des techniques d'histologie (Broman, 1964), et fut confirmée dans les années 1980 par des techniques d'IRM (Ebers *et al.*, 1984). Les lésions en SEP sont invariablement centrées autour de vaisseaux sanguins (Kermode *et al.*, 1990).

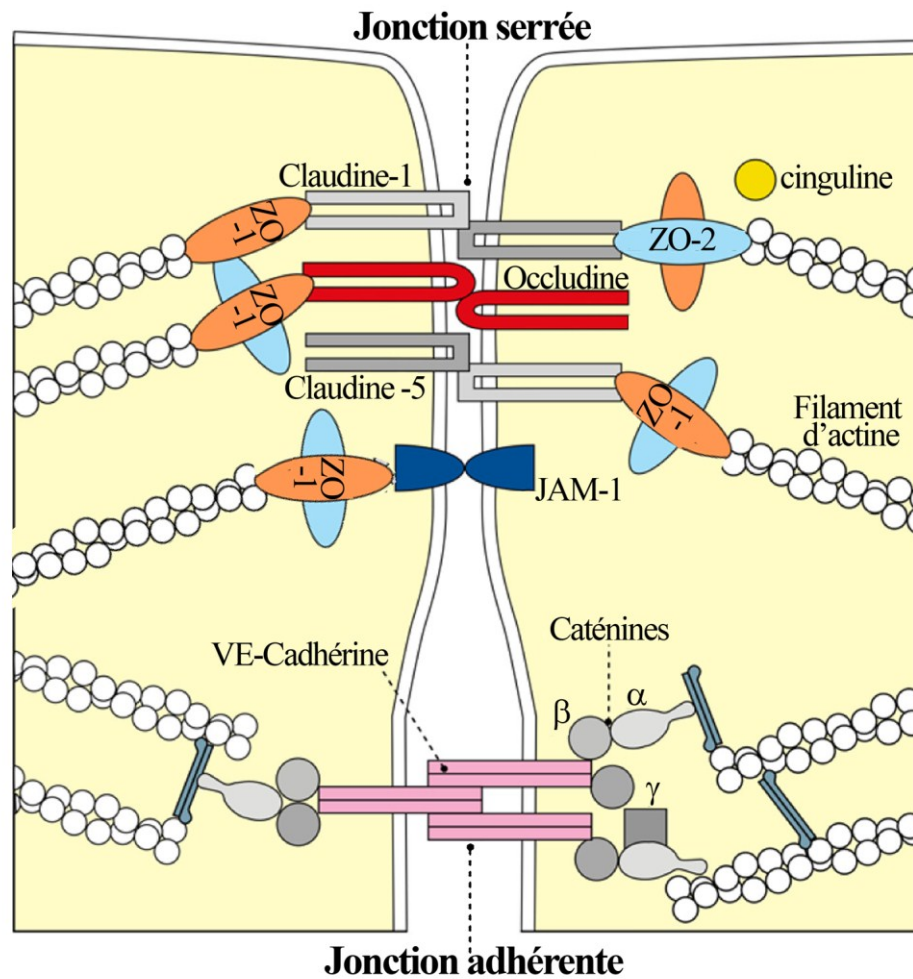
3.1.1 Les cellules endothéliales

Les cellules endothéliales de la BHE se distinguent de leurs homologues de la périphérie par l'absence de fenestrations (Fenstermacher *et al.*, 1988), le faible dénombrement de vésicules de pinocytose (endocytose non spécifique) (Sedlakova *et al.*, 1999), de nombreuses mitochondries qui sont le reflet d'un métabolisme énergétique intense, et la présence de jonctions serrées (Kniesel and Wolburg, 2000). Les cellules endothéliales sont disposées en monocouche le long de la paroi des vaisseaux sanguins et reposent sur la matrice extracellulaire produite par les cellules endothéliales elles-mêmes et les astrocytes (Mandarino *et al.*, 1993). Les cellules endothéliales cérébrales expriment le facteur von Willenbrand, qui est exprimé par la plupart des cellules endothéliales et qui est impliqué dans la coagulation (Ruggeri, 2003), les lectines dérivées des plantes, *Ulex europaeus agglutinin I* et *Lycopersicon esculentum* (Leech *et al.*, 2007; Mazzetti *et al.*, 2004), une glycoprotéine transmembranaire, la neurothéline (ou aussi appelé HT7) (Prat *et al.*, 2001), ainsi que la molécule caveolin-1 (Prat and Antel, 2005). De plus, les cellules endothéliales expriment des transporteurs spécifiques tels que le transporteur de glucose GLUT-1, le récepteur de la transferrine, et bien d'autres qui sont essentiels pour assurer les échanges de nutriments entre le sang et le cerveau (Abbott *et al.*, 2006). Pour assurer le

transport des substances toxiques à l'extérieur du SNC (et donc vers le sang), les cellules endothéliales expriment également des pompes à efflux telles que la P-glycoprotéine, et MRP-1 (Multidrug resistance protein-1) (Ueno, 2007). De par leur localisation stratégique, les cellules endothéliales jouent un rôle clé dans le contrôle des réponses immunitaires prenant part au SNC. En effet, en réponse à une inflammation, elles ont la capacité de moduler l'expression de nombreuses molécules telles que les molécules d'adhérence, les chimiokines et les cytokines qui permettant de recruter spécifiquement des sous-types de cellules immunitaire (Engelhardt, 2006). Cette importante partie est traitée avec plus détails dans la section sur la migration des cellules immunitaires au SNC.

3.1.1.1 Les jonctions serrées et adhérentes

Le paramètre le plus important reflétant l'imperméabilité d'un endothélium est l'existence de complexes jonctionnels entre les cellules endothéliales. Ces complexes jonctionnels sont composés de JS et de jonctions adhérentes (JA) (Figure 7) (Hawkins and Davis, 2005). Une rupture au niveau des JA conduit à une augmentation de la perméabilité (Abbruscato and Davis, 1999), mais ce sont principalement les JS qui confèrent l'imperméabilité paracellulaire et la haute résistance électrique trans-endothéliale (TEER). Au niveau des capillaires cérébraux, un réseau de JS relie de façon continue chacune des cellules endothéliales à ces voisines. On parle d'un endothélium continu (Brightman and Reese, 1969).



Adapté de Förster *et al.*, *Histochem Cell Biol*, 2008

Figure 7: Composition des jonctions serrées et adhérentes des cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique.

Les protéines transmembranaires des jonctions serrées, occludine, claudines et JAMs, sont reliées aux filaments d'actine du cytosquelette par des protéines d'ancrages telles que ZO-1, ZO-2, ZO-3 et cinguline. De la même manière, les protéines transmembranaires des jonctions adhérentes, les cadhérines, sont reliées aux filaments d'actine du cytosquelette par des protéines d'ancrages, les caténines.

Entre deux cellules endothéliales, les JS se retrouvent plus près du côté apical que les JA. On dénombre trois familles de protéines qui participent à la formation des JS et qui sont toutes de type transmembranaire: l'occludine, les claudines et les « junctional adhesion molecules » (JAMs) (Wolburg and Lippoldt, 2002). Il existe 3 types de JAMs : JAM-A, -B, et -C. Autant les JAMs que l'occludine se lient de manière homotypique. Quant aux claudines, on en connaît plus de 20, mais seulement quatre d'entre elles sont exprimées dans la BHE : claudin-1, -3, -5 et -12. Les claudines peuvent former des liens homophiliques ou hétérophiliques. Ces protéines transmembranaires sont reliées au cytosquelette d'actine via des protéines d'ancrages /accessoires telles que ZO-1, -2, -3, cinguline et autres (Wolburg and Lippoldt, 2002). Quant aux JAs, elles sont constituées de cadhérines membranaires qui se lient au cytosquelette d'actine via des molécules intermédiaires, les caténines (Ballabh *et al.*, 2004).

Les JS peuvent être modifiées par plusieurs facteurs, comme la concentration extracellulaire en calcium, la phosphorylation de certaines des protéines les constituant, ou encore en conditions pathologiques telles que les tumeurs au cerveau et la SEP (Persidsky *et al.*, 2006; Zlokovic and Apuzzo, 1998). En effet, l'étude de coupes de cerveau de patients atteints de SEP RR-MS et PP-MS a révélé une expression significativement plus faible d'occludine, et de la protéine d'ancrage ZO-1 (Kirk *et al.*, 2003; Plumb *et al.*, 2002). De plus, des études ont démontré une diminution d'expression d'occludine et de ZO-1 lorsque les cellules endothéliales étaient mises en présence de TNF, d'IFN- γ , d'IL-1 β (Afonso *et al.*, 2007; Fabry *et al.*, 1995; Forster *et al.*, 2008) ou d'IL-17 (Kebir *et al.*, 2007), des cytokines pro-inflammatoires impliquées dans la pathogénèse de la SEP. Ces données démontrent l'importance du processus inflammatoire dans l'augmentation de la perméabilité observée en SEP.

3.1.2. La membrane basale

La membrane basale (ou matrix extracellulaire) sur laquelle repose l'endothélium cérébrale sert d'ancrage aux cellules endothéliales tout en les séparant des pieds astrocytaires. Elle est formée de trois couches, avec une couche composée majoritairement de laminine-4 et -5 qui sont produits par les cellules endothéliales, une couche composée de laminine-1 et -2 produits par les astrocytes et une autre couche formée de collagène IV produit à la fois par les cellules endothéliales et les astrocytes (Perlmutter and Chui, 1990). Chacune de ces couches contient également d'autres types de collagène, des glycoprotéines et des protéoglycan (Abrahamson, 1986; Persidsky *et al.*, 2006). Les cellules endothéliales sont attachées à la matrice extracellulaire via des intégrines, et à un degré moindre, via les dystroglycanes (del Zoppo and Milner, 2006).

L'expression des JS par les cellules endothéliales est directement liée à la présence de facteurs astrocytaires (Dehouck *et al.*, 1990; Rubin *et al.*, 1991b) et à l'adhésion des cellules endothéliales à la matrice extracellulaire (Osada *et al.*, 2011). De nombreuses études ont démontré que la culture *in vitro* de cellules endothéliales en présence de collagène et de milieu conditionné d'astrocytes permettait d'induire l'expression des jonctions serrées telles que l'occludine et claudine-5 (Arthur *et al.*, 1987; Savettieri *et al.*, 2000; Shivers *et al.*, 1988). Ainsi, bien que longtemps sous-estimé, la contribution de la membrane basale dans l'induction et le maintien des propriétés de la BHE est aujourd'hui bien reconnue.

Une étude des coupes de cerveau de patients atteints de SEP a démontré qu'il y avait une réduction de l'expression des intégrines et de laminine au niveau des lésions, suggérant une BHE plus perméable (Sobel *et al.*, 1998). Il a été découvert que des enzymes de type métalloprotéinase matricielle (MMPs) étaient en mesure de dégrader les protéines de la matrice extracellulaire (Mott and Werb, 2004). Particulièrement, il a été révélé que les MMP-2 et -9 étaient cruciales pour l'entrée des cellules immunitaires dans le SNC et pour l'induction de l'EAE (Agrawal *et al.*, 2006). Ces MMPs sont principalement produites par

les macrophages, les DCs et les lymphocytes T activés. Ainsi, ces cellules immunitaires peuvent traverser la membrane basale via l'expression de ces MMPs. De plus, les patients RR-MS montrent un niveau significativement plus élevé de MMP-9 dans leur sérum et leur LCR que les contrôles, suggérant la présence de cellules immunitaires avec un niveau d'activation élevé dans la périphérie des patients RR-MS (Fainardi *et al.*, 2006; Leppert *et al.*, 1998). Aussi, une étude a révélé que l'augmentation du niveau de MMP-9 dans le sérum de patients RR-MS était corrélée avec l'apparition de nouvelles lésions détectées par IRM (Waubant *et al.*, 1999), suggérant la possibilité d'utiliser l'évaluation de MMP-9 dans le sérum comme outil de pronostic.

3.1.3 Les Astrocytes et Péricytes

Les astrocytes sont les cellules les plus abondantes du SNC et constituent environ 90% des cellules gliales d'un cerveau humain (He and Sun, 2007). Les astrocytes ont plusieurs fonctions au sein du SNC : ils apportent un soutien aux neurones en maintenant un équilibre ionique et un pH adéquat, et peuvent même moduler la transmission synaptique en captant des neurotransmetteurs tels que le glutamate (Kang *et al.*, 1998; Nedergaard *et al.*, 2003). En plus, les astrocytes sécrètent une multitude de facteurs tels que la Neutrotrophine-3 favorisant la survie des neurones et des oligodendrocytes (Dreyfus *et al.*, 1999). Les astrocytes jouent également un rôle crucial au niveau de la différenciation des cellules endothéliales de la BHE ainsi que dans la formation de la BHE. Les pieds astrocytaires entourent les capillaires du cerveau permettant un échange constant entre les cellules endothéliales de la BHE et les astrocytes. Ainsi, il a été démontré que les facteurs solubles produits par les astrocytes contribuent au caractère imperméable de la BHE en favorisant l'expression de JS par les cellules endothéliales de la BHE (Dehouck *et al.*, 1990; Rubin *et al.*, 1991a). Le facteur de croissance GDNF (glial cell line-derived neurotrophic factor), le TGF- β , le bFGF (basic fibroblast growth factor) (Abbott *et al.*, 2006), l'angiopoiétine-I (Lee *et al.*, 2003), et plus récemment l'angiotensine-II (Wosik *et*

al., 2007) ne sont que quelques exemples de facteurs produits par les astrocytes contribuant à l'étanchéité de la BHE.

Les astrocytes se caractérisent par l'expression de la protéine GFAP (glial fibrillary acidic protein), dont l'expression est augmentée suite à leur activation. Une étude a révélé que les souris GFAP KO présente une BHE affaiblie, avec une augmentation de la perméabilité en comparaison aux souris sauvages (WT) (Liedtke *et al.*, 1996), démontrant ainsi le rôle de soutien des astrocytes à la formation d'une BHE étanche.

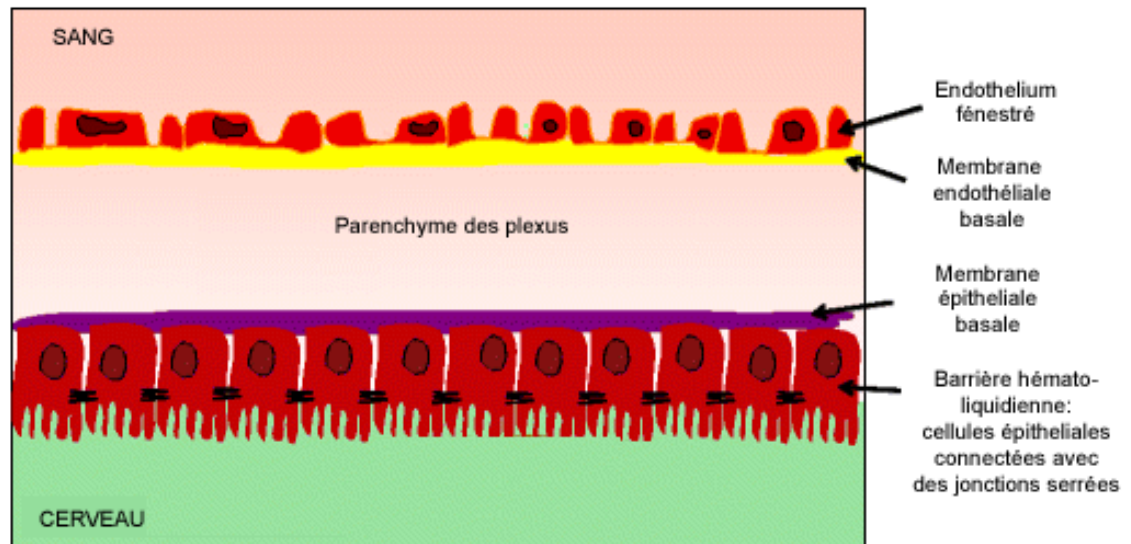
Quant aux péricytes, on leur accorde un rôle similaire à celui des astrocytes pour le maintien de la BHE. En effet, il a été démontré que les cultures de cellules endothéliales de la BHE présentaient une perméabilité plus faible lorsqu'elles étaient mises en culture en présence d'astrocyte et de péricytes en comparaison avec des cultures de cellules endothéliales avec seulement les astrocytes ou seulement les péricytes (Nakagawa *et al.*, 2007). En plus, le fait que les péricytes partagent la membrane basal avec les cellules endothéliales laisseraient envisager un soutien structurel de la part des péricytes aux cellules endothéliales (Ballabh *et al.*, 2004). Cependant, le manque de marqueur propre aux péricytes et donc la difficulté d'avoir des cultures pures fait en sorte que ce sont des cellules dont l'étude est pour l'instant limitée et sujet à débat.

3.2 La barrière hémato-liquidienne

De la même manière que la BHE, ce qui caractérise l'étanchéité de la barrière hémato-liquidienne est la présence de JS telles que claudine-1, claudine-2 et claudine-11 entre les cellules épithéliales des plexus choroïdes, rendant ainsi le passage paracellulaire pratiquement impossible (Bronstein *et al.*, 2000; Wolburg *et al.*, 2001). Cette barrière protège donc le LCR des éléments sanguin. Mais en plus de servir de barrière, les cellules épithéliales des plexus choroïdes sont responsables de la production de LCR. Et tout comme les cellules endothéliales de la BHE, les cellules épithéliales des plexus choroïdes

possèdent de nombreux systèmes de transports permettant le passage d'ions et de nutriments entre le sang et le LCR, ainsi que l'expulsion de molécules toxiques du LCR vers le sang (de Lange, 2004; Engelhardt and Sorokin, 2009).

Jusqu'à présent, il a été très difficile, voire impossible, de démontrer l'entrée de cellules immunitaires périphériques dans le SNC via la barrière hémato-liquidienne. Autant les coupes de cerveaux de patients atteints de SEP que les différents modèles d'EAE montrent très peu ou pas d'accumulation de cellules dans le parenchyme des plexus choroïdes ou au niveau de la barrière en tant que telle (Engelhardt and Sorokin, 2009). Pour entrer dans le SNC via la barrière hémato-liquidienne, il faudrait en premier lieu que les cellules immunitaires traversent les capillaires des plexus choroïdes pour se retrouver dans le parenchyme des plexus. En tant que telle, cette première étape est tout à fait réalisable pour les cellules immunitaires puisque les capillaires à ce niveau-là présentent des fenestrations permettant le passage aisé des cellules (voir Figure 8). Cependant le parenchyme des plexus se retrouvent anatomiquement encore à l'extérieur du SNC. De là, les cellules immunitaires doivent traverser la barrière hémato-liquidienne pour se retrouver dans le LCR. Et la migration des cellules immunitaires nécessite la présence de molécules d'adhérence à la surface des cellules épithéliales. Or, bien que l'expression de ICAM-1 et VCAM-1 (deux molécules d'adhérence bien caractérisées) ait été décrite sur les cellules épithéliales des plexus choroïdes en EAE, ces molécules sont exprimées du côté apical des cellules épithéliales, et non pas du côté basal (Wolburg *et al.*, 1999). Ainsi, les cellules immunitaires ont la possibilité de sortir du SNC et du LCR via la barrière hémato-liquidienne, mais rien n'indique que les cellules immunitaires peuvent entrer du sang vers le SNC via cette barrière, ce qui laisserait sous-entendre également que les cellules immunitaires qui se retrouvent dans le LCR auraient préalablement traversé la BHE avant d'atteindre cette partie du cerveau (Prat *et al.*, 2001).



Adapté de Engelhardt et Sorokin, *Semin Immunopathol*, 2009

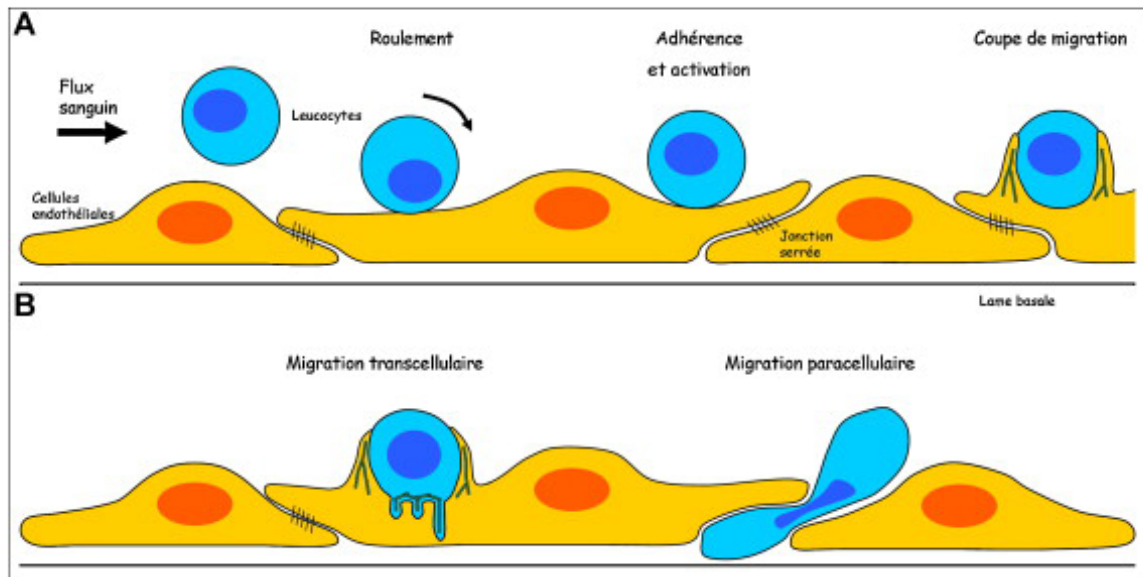
Figure 8: Structure de la barrière hémato-liquidienne.

La barrière hémato-liquidienne filtre les échanges entre le sang et le LCR. Les cellules épithéliales des plexus choroïdes connectées entre elles par des jonctions serrées forment cette barrière. Le côté basale de la barrière se trouve du côté du parenchyme des plexus, alors que le côté apical où les molécules d'adhérence ont été retrouvées se trouve du côté du LCR, et donc dans le SNC.

Ainsi, bien que d'après nos connaissances actuelles, seule la BHE permettrait l'entrée des cellules immunitaires au SNC, une étude a récemment démontré que les souris CCR6 KO développaient un EAE moins sévère. Ce phénomène était expliqué par les auteurs par le fait que le passage via les cellules épithéliales des plexus choroïdes, producteur de la chimiokine CCL20, le ligand de CCR6, était bloqué (Reboldi *et al.*, 2009). Toutefois, quelques mois plus tard, une autre étude a démontré l'opposé en révélant que les souris CCR6 KO développaient une maladie plus sévère que les souris WT (Elhofy *et al.*, 2009). Ainsi, il existe en ce moment un débat quant à savoir si les cellules immunitaires peuvent rejoindre le parenchyme du CNS via la barrière hémato-liquidienne, en atteignant en premier lieu le LCR. Toutefois, selon toute logique, il semble peu probable que cela se produise puisque tous les foyers d'infiltration cellulaire retrouvés chez les patients SEP le sont autour de vaisseaux sanguin. De plus, il semble difficile à imaginer qu'une fois pris dans la circulation du LCR, les cellules immunitaires puissent se diriger vers un site anatomique précis du SNC.

3.3 La migration des cellules immunitaires au SNC

Le passage des leucocytes à travers l'endothélium a lieu lors de processus physiologiques comme l'immuno-surveillance et à une plus grande échelle lors d'inflammation où le microenvironnement est modifié. Lors du processus inflammatoire, les cytokines pro-inflammatoires présentes dans le SNC induisent l'expression de molécules d'adhérence, d'intégrines, de chimiokines, et de cytokines par les cellules endothéliales facilitant le passage des cellules immunitaire. La migration s'effectue en 4 étapes (Springer, 1994) telle qu'illustrée à la figure 9.



Tiré de Weiss *et al.*, *Revue Neurologique*, 2009

Figure 9: La migration transendothéliales des leucocytes.

Les cellules immunitaires suivent un processus en quatre étapes menant à leur migration à travers la BHE : (A) en premier lieu, les leucocytes roulent le long de l'endothélium via les protéines de la famille des sélectines. Suite au roulement, les cellules endothéliales sécrètent des chimiokines induisant l'activation des intégrines telles que LFA-1 et VLA-4, qui se lient aux molécules d'adhérence sur la BHE telles qu'ICAM-1, VCAM-1 et ALCAM. (B) Cette liaison entraîne l'arrêt des cellules immunitaires et la formation de « coupe de migration » menant à la migration des cellules par voie transcellulaire ou paracellulaire.

La première étape de la migration leucocytaire implique un contact initial entre le leucocyte et la cellule endothéliale médié par des sélectines et leur ligand. Ce premier contact permet aux cellules de ralentir et de rouler le long de la paroi endothéliale sous les forces du flux sanguin. La famille des sélectines comprend trois membres : L-sélectine (L pour leucocyte), P-sélectine (P pour plaquettes) et E-sélectine (E pour endothéliale). L-sélectine est exprimée uniquement sur les leucocytes alors que les deux autres types, E et P, sont exprimés par les cellules endothéliales (Kubes and Ward, 2000). L-sélectine peut se lier à GLYCAM-1 (glycosylation-dependent cell adhesion molecule 1), CD34 et MAdCAM-1 (mucosal vascular addressin cell adhesion molecule 1) à la surface des cellules endothéliales, alors que le ligand principal de P-sélectine est PSGL-1 (P-Selectin Glycosylated Ligand 1) et celui d'E-sélectine est ESL-1 (E-Selectin Ligand 1) (McEver and Zhu, 2010).

Ce contact entre les cellules endothéliales et les cellules immunitaires induit la sécrétion de chimiokines par les cellules endothéliales. La liaison des chimiokines à leur récepteur va permettre activation des cellules immunitaires qui vont augmenter leur expression d'intégrines permettant l'adhésion ferme des cellules à l'endothélium. MCP-1 (monocyte chemoattractant protein 1; CCL2), l'IL-8 (CXCL8) (Biernacki *et al.*, 2001; Kebir *et al.*, 2007), MIP-1 α (macrophage inflammatory protein 1 α ; CCL4), IP-10 (Interferon gamma-induced protein 10) et RANTES (regulated upon activation, normal T-cell expressed, and secreted; CCL5) sont toutes des chimiokines importantes pour le recrutements des lymphocytes Th1 et Th17, ainsi que pour celui des monocytes (Engelhardt and Ransohoff, 2005; Mahad *et al.*, 2006; Ransohoff, 2002).

La troisième étape consiste en l'adhésion ferme et l'arrêt des cellules immunitaires les préparant à leur extravasation. Cette étape s'effectue via la liaison entre les intégrines exprimées par les leucocytes et les molécules d'adhérence exprimées par les cellules endothéliales. Les intégrines sont des protéines hétérodimériques formées par l'association d'une chaîne α et d'une chaîne β . Les intégrines $\alpha 4\beta 1$ (VLA-4, Very Late Antigen 4), $\alpha L\beta 2$ (LFA-1, Lymphocyte Function associated Antigen 1) et $\alpha 4\beta 7$ sont les intégrines les plus

impliquées dans les interactions leucocytes-cellules endothéliales. Leurs ligands appartiennent à la superfamille des immunoglobulines, comme ICAM-1 (Intercellular Cell Adhesion Molecule 1) et VCAM-1 (Vascular Cell Adhesion Molecule 1) (Biernacki *et al.*, 2001; Greenwood *et al.*, 1995; Prat *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 1999). Plus récemment, ALCAM (Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule) a été identifiée comme étant une nouvelle molécule d'adhérence pouvant se lier de manière homotypique sur les monocytes et lymphocytes B ou hétérotypique avec CD6 exprimé sur les lymphocytes T (Cayrol *et al.*, 2008).

La diapédèse des leucocytes à travers la BHE peut s'effectuer de manière paracellulaire ou transcellulaire. Avant de traverser la BHE, suite à l'adhésion ferme, les cellules immunitaires vont ramper le long de l'endothélium afin de trouver le lieu préférentiel pour migrer (Phillipson *et al.*, 2006; Schenkel *et al.*, 2004). Cette étape est médiée par l'interaction des intégrines avec les molécules d'adhérence, et va donner lieu à la formation d'une structure en forme de coupe par les cellules endothéliales nommée « coupe de migration ». Il s'agit de projections membranaires des cellules endothéliales riches en molécules d'adhérence et en molécules du cytosquelette présentes pour guider la diapédèse (Carman and Springer, 2004; Carman and Springer, 2008; Cayrol *et al.*, 2008). Les différentes JAMs interagissent avec les intégrines telles que LFA-1 et VLA-4 tandis PECAM-1 (Platelet endothelial cell adhesion molecule 1) et CD99 interagissent de manière homotypique menant à un relâchement des JS, ce qui aura pour conséquence l'ouverture de la BHE (Ley *et al.*, 2007; Muller *et al.*, 1993; Nourshargh *et al.*, 2006). Le mode de passage paracellulaire semblerait être le plus utilisé par les cellules immunitaires avec un dénombrement variant entre 60 et 80% des migrations observées (Carman, 2009). Parvenus dans le parenchyme, les cellules immunitaires suivent les gradients de chimiokines secrétées par les cellules immunitaires déjà présentes, les cellules nerveuses lésées et les cellules gliales.

En EAE et en SEP, les cellules endothéliales de la BHE surexpriment les molécules d'adhérence et l'inhibition de cette liaison avec les intégrines leucocytaires a rapidement

été ciblée pour contrer l'entrée des cellules immunitaires dans le SNC. L'injection d'anticorps monoclonaux dirigés contre les molécules d'adhérence ICAM-1 (Archelos *et al.*, 1993), VCAM-1 (Engelhardt *et al.*, 1998), ALCAM (Cayrol *et al.*, 2008) ou leurs ligands, LFA-1 (Gordon *et al.*, 1995) et VLA-4 (Yednock *et al.*, 1992) ont démontré des effets bénéfiques en EAE en diminuant l'infiltration cellulaire et par conséquent, l'inflammation. D'ailleurs, suite aux études sur les souris, l'anti-VLA-4 a été testé chez les humains où des effets d'une étonnante efficacité ont pu être observés (Miller *et al.*, 2003). Aujourd'hui, l'anti-VLA-4 fait partie d'une des cinq médications acceptées en SEP pour la forme RR-MS. Cependant, en raison de son extrême efficacité à bloquer le passage de toutes les cellules immunitaires dans le SNC, plusieurs patients ont été incapables de combattre une infection virale spécifique du SNC, soit le John Cunningham (JC) Virus, responsable de la leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP), maladie démyélinisante sévère du SNC (Kleinschmidt-DeMasters and Tyler, 2005; Langer-Gould *et al.*, 2005). Cet aspect sera traité avec plus de détails dans la prochaine section où il sera question des thérapies en SEP. Néanmoins, l'extrême efficacité à diminuer l'inflammation cérébrale par l'inhibition de la liaison des molécules d'adhérence aux intégrines laissent entrevoir la possibilité d'exploiter cette interaction dans le but de traiter la SEP.

4. Les traitements en sclérose en plaques

4.1 Généralités

Cette section revêt une importance capitale, car le but essentiel de la recherche est d'aboutir à des outils pour combattre infections et maladies nuisibles tout en respectant bien entendu les règles d'éthiques. Dans le cas de la SEP, actuellement il n'existe aucun traitement curatif. Cependant, dépendamment du stade de la maladie, il existe cinq options thérapeutiques approuvées permettant une meilleure gestion des symptômes : l'IFN- β , l'acétate de glatiramère (GA), la mitoxantrone, le natalizumab et le fingolimod. Tous ces traitements ont démontré une certaine efficacité sur la maladie des patients diagnostiqués avec la forme RR-MS. L'IFN- β et la mitoxantrone sont également en partie efficaces pour les traitements des patients atteints de la forme SP-MS. Malheureusement, aucune thérapie n'est disponible pour le moment pour les patients atteints de la forme PP-MS. Cet état de fait s'explique par la difficulté à recruter un nombre suffisant de patients dans la conception d'essais cliniques, ainsi que par la nature neurodégénérative de la forme PP-MS. En plus des 5 traitements actuellement disponibles et approuvés, il existe une panoplie de molécules qui sont en essais cliniques et qui ont, pour la plupart, démontré une efficacité à inhiber l'induction de l'EAE. Une liste complète des molécules actuellement prescrites et à l'essai est disponible au tableau III. Toutes ces molécules ont été façonnées dans le but de diminuer (immunomodulateurs) ou d'inhiber entièrement (immunosuppresseurs) la réponse inflammatoire observée en SEP.

Tableau III: Traitements actuels et en essais pour la sclérose en plaques.

Traitements	Mécanisme d'action
IMMUNOMODULATEURS	
Interferon β	Inhibe l'activation des cellules T Inhibe la migration des lymphocytes au SNC Induit une réponse anti-inflammatoire
Acétate de glatiramère	Induit un phénotype Th2 de la part des CD4 Induit un profil anti-inflammatoire sur les CPAs
Acide Fumaric (BG12)	Augmente l'expression des cytokines de type Th2
Laquinimod	Induit un phénotype Th2 de la part des CD4 Inhibe la migration des leukocytes au SNC Inhibe l'expression de CMH par les CPAs
Teriflunomide	Inhibe la prolifération des lymphocytes (par l'IL-2)
Statines	Induit un phénotype Th2 de la part des CD4
IMMUNOSUPPRESSEURS : général	
Mitoxantrone	Inhibe la présentation d'antigène Diminue le taux de lymphocytes
Cladribine	Diminue le taux de lymphocytes T CD4 et B
Cyclophosphamide	Diminue le taux de lymphocytes
Azathioprine	Diminue le taux de lymphocytes
Vaccin à ADN codant pour la protéine MBP	Induit une tolérance spécifique Induit la mort cellulaire non-spécifique

Tableau III (suite)

Traitements	Mécanisme d'action
IMMUNOSUPPRESSEURS : spécifiques	
Rituximab (anti-CD20)	Induit la déplétion les lymphocytes B
Alemtuzumab (anti-CD52)	Induit la déplétion les lymphocytes T
IMMUNOSUPPRESSEURS : Séquestration des cellules immunitaires	
FTY720 (fingolimod)	Séquestration des leucocytes dans les ganglions
IMMUNOSUPPRESSEURS : Ligands de cellules immunitaires	
Dacluzimab (anti-CD25)	Inhibe l'activation des lymphocytes
Natalizumab (anti-VLA4)	Inhibe l'entrée des leucocytes au SNC
Reconstitution du système immunitaire	
Transplantation de moelle osseuse	Immunosuppression presque totale Reconstitution du système immunitaire

4.2 Traitements actuellement prescrits

4.2.1 Immunomodulateurs

Les traitements de premières lignes pour les patients RR-MS sont l'IFN- β et le GA qui sont des immunomodulateurs, c'est-à-dire qu'ils ont pour but de diminuer la réponse inflammatoire de manière générale. Ils sont mieux tolérés que les traitements de seconde ligne qui sont des immunosuppresseurs. L'IFN- β a été le premier traitement utilisé en SEP, et ce afin de bloquer l'activité de l'IFN- γ . Les mécanismes d'actions présumés en SEP sont l'inhibition de l'activation des lymphocytes T, l'induction des cytokines anti-inflammatoires par les leucocytes telles que l'IL-4 et l'IL-10, l'inhibition des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IFN- γ et l'IL-17, ainsi que l'inhibition de la migration des lymphocytes T au SNC en diminuant l'expression des MMPs par les lymphocytes (Yong *et al.*, 1998). L'IFN- β réduit de 30% la fréquence des poussées des patients RR-MS et SP-MS, réduit également la progression des lésions, ainsi que celle du handicap fonctionnel. Ce traitement est associé à certains effets secondaires mineurs tels que le syndrome grippal (Group, 1998; Jacobs *et al.*, 1996).

Le second composé de première ligne est le GA. Le GA est un polypeptide obtenu par synthèse de quatre acides aminés (L-alanine, acide L-glutamique, L-lysine, L-tyrosine) que l'on retrouve dans le MBP. À la base, il y a 40 ans aujourd'hui, cette molécule avait été créée dans le but d'induire l'EAE, mais c'est l'effet inverse qui fut observé (Teitelbaum *et al.*, 1971). Son mode d'action dans la SEP n'est pas très bien compris à l'heure actuelle. Il a été démontré que le GA est capté par les CPAs qui vont induire une réponse de type Th2 des lymphocytes T CD4⁺ dont le TCR reconnaît spécifiquement GA (Yong, 2002). L'hypothèse fonctionnelle concernant le GA soutient que les lymphocytes Th2-GA spécifique sont en mesure de migrer dans le SNC, et sont en compétition avec les lymphocytes T-MBP spécifique, car les lymphocytes GA-spécifique sont capables de réagir aux peptides MBP présentés par les CPAs (Aharoni *et al.*, 1997; Lalive *et al.*, 2011). Tout

comme l'IFN- β , le GA induit une réduction de 30% du nombre de poussées chez les patients RR-MS (Johnson *et al.*, 1995). Ainsi, en termes d'efficacité, il n'existe pas de différence entre les deux traitements de première ligne, quoique les effets thérapeutiques ne sont que partiellement efficaces. Ainsi, des traitements de seconde ligne plus agressifs ont été développés.

4.2.2 Immunosuppresseurs

À l'heure actuelle, il existe 3 différentes options pour les traitements de seconde ligne : la mitoxantrone, le natalizumb et le fingolimod. Bien que chacun de ces traitements montrent une efficacité plus élevée que les traitements de première ligne, ils sont cependant associés à des effets secondaires bien plus nocifs.

La mitoxantrone est un agent chimique développé dans les années 1970 dans le but de traiter une variété de cancers tels que des lymphomes, des leucémies ainsi que les métastases liées au cancer du sein (Ellis and Boggild, 2009). Depuis la fin des années 1990, la mitoxantrone est utilisée pour les patients RR-MS qui subissent des épisodes sévères laissant des séquelles importantes et pour les patients SP-MS. La mitoxantrone agirait en interférant avec la synthèse d'ADN et d'ARN des lymphocytes T et B, ce qui aurait pour conséquence l'inhibition de leur prolifération et l'induction de la mort cellulaire. Ces effets sont d'autant plus efficaces sur une population qui se renouvelle rapidement, et qui est donc active. De plus, on attribue au mitoxantrone la capacité d'inhiber la maturation et la présentation d'antigène par les DCs (Neuhaus *et al.*, 2005). Le traitement au mitoxantrone permet de réduire de 60% la fréquence annuelle des poussées par les patients RR-MS et SP-MS (Hartung *et al.*, 2002). De plus, le mitoxantrone présente un avantage considérable en comparaison aux traitements de première ligne : il suffit d'une injection intraveineuse tous les 3 mois, contrairement à l'IFN- β et au GA dont les traitements peuvent varier d'une injection intramusculaire par semaine à une injection sous-cutanée par jour. Cependant ce traitement est lié à des effets secondaires plus nuisibles tels que le vomissement (62% des

cas), l'infection des voies respiratoires (35% des cas), l'infection des voies urinaires (25% des cas), et les plus sérieux de tous, la toxicité cardiaque (3-4% des cas) ainsi que l'émergence de cancers du sang (1/300) (Martinelli *et al.*, 2009).

Le natalizumab est un anticorps monoclonal humanisé qui cible l'intégrine $\alpha 4$ empêchant les cellules immunitaires de se lier à la BHE et donc de migrer au SNC (Engelhardt and Kappos, 2008). Il est administré par voie intraveineuse une fois par mois. Plusieurs études en EAE ont démontré l'extrême efficacité de ce traitement (Theien *et al.*, 2001; Yednock *et al.*, 1992). En SEP, le natalizumab permet une réduction de 68% du taux annualisé de poussées par les patients RR-MS, une réduction de 42% du risque de progression du handicap, et plus impressionnant, une réduction de 83% du nombre de lésions observées par IRM (Polman *et al.*, 2006). En plus, il a été observé une très nette diminution du nombre de cellules retrouvées dans le LCR des patients RR-MS traités au natalizumab en comparaison avec les patients non-traités (Stuve *et al.*, 2006a). Cette diminution au niveau des comptes cellulaires dans le LCR demeure présente 6 mois après la prise du dernier traitement, reflétant l'extrême efficacité de cette thérapie. Cependant, 8 ans après son introduction aux États-Unis, on dénombre 89 cas de LEMP, dont plus de 22% ont été mortels. La LEMP, d'évolution rapidement mortelle, survient presque exclusivement chez des individus immunosupprimés, et notamment chez les patients infectés par le virus de l'immunodéficience humaine (VIH) (Kleinschmidt-DeMasters and Tyler, 2005; Langer-Gould *et al.*, 2005). Le virus JC, responsable de la LEMP, est en temps normal un virus très bien contrôlé par le système immunitaire, et en particulier, par les lymphocytes $CD8^+$ TEM (Du Pasquier *et al.*, 2003; Du Pasquier *et al.*, 2004; Koralnik *et al.*, 2002). Cependant aucune étude n'a pu démontrer le lien de cause à effet entre le natalizumab et l'absence d'immuno-surveillance par les lymphocytes T $CD8^+$ dans le SNC. En 2006, le natalizumab a été réinséré dans le marché, mais plusieurs cas de LEMP associé au traitement ont été révélés. Aujourd'hui, on considère à 1 chance sur 589 le risque de développer la LEMP suite à un traitement de natalizumab. Les données montrent que le risque pour un patient de développer une LEMP augmente avec la durée de traitement, particulièrement après deux

ans. Ainsi, bien que ce traitement soit le plus efficace de tous, le niveau de risque lié à cette médication fait en sorte que c'est un traitement qui est administré en dernier lieu, seulement suite aux échecs des autres thérapies.

Le fingolimod a été approuvé en avril 2011 par Santé Canada pour le traitement de la SEP sous sa forme RR-MS. C'est la première médication orale pour la SEP d'où l'engouement des patients pour cette molécule. Le fingolimod est un analogue de la sphingosine qui est phosphorylé par les kinases de sphingosine. Dans sa forme phosphorylé, le fingolimod est un puissant agoniste des récepteurs de sphingosine-1-phosphate. En se liant aux récepteurs, le fingolimod phosphorylé favorise la séquestration des cellules immunitaires dans le thymus et les ganglions lymphatiques, diminuant les comptes lymphocytaire en périphérie et empêchant ainsi la migration des leucocytes dans le SNC (Scott, 2011). Ce phénomène est partiellement réversible suite à l'arrêt du traitement. Et bien qu'il soit possible de croire qu'un traitement au fingolimod serait responsable d'une immunosuppression générale, ce n'est pourtant pas le cas. Les patients traités au fingolimod sont en mesure de soutenir une réponse immunitaire face à des infections virales (Mehling *et al.*, 2011). En SEP, le fingolimod induit une diminution de 55% de la fréquence des poussées chez les patients RR-MS et une réduction de 30% du risque de progression du handicap (Kappos *et al.*, 2006). Les effets secondaires concernent principalement les troubles du rythme cardiaque et un accroissement des risques d'infection dont deux cas d'infections herpétiques graves qui se sont révélés mortels et d'un cas mortel de pneumonie au virus varicella-zoster.

4.3 Traitements en essais

Il existe de nombreuses molécules qui sont à l'essai dans le but d'améliorer la qualité de vie des patients atteints de SEP. Parmi les plus intrigantes de la liste énumérée au tableau III figure les statines. Les statines sont couramment employées dans les maladies cardio-vasculaires. Elles permettent de diminuer le taux en cholestérol en inhibant l'enzyme

3-hydroxy-3-méthhylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) réductase qui joue un rôle capital dans la biosynthèse du cholestérol. Mais de plus en plus de données indiquent que les statines ont également des effets anti-inflammatoires en induisant un profil Th2 de la part des lymphocytes T CD4⁺ (Stuve *et al.*, 2004; Youssef *et al.*, 2002). Ainsi, certaines équipes de recherches ont testé l'effet des statines en EAE, et ont démontré l'efficacité des statines à inhiber le développement de la maladie (Stuve *et al.*, 2006b; Youssef *et al.*, 2002). Ainsi, le fait que les statines soient un traitement qui est utilisé depuis près de 20 ans dans le contrôle des maladies cardio-vasculaire, et qu'elles soient extrêmement bien toléré fait en sorte qu'elles représentent une option intéressante.

Parmi la liste des molécules à l'essai, il y a des anticorps monoclonaux tels que l'alemtuzumab (anti-CD52, exprimé par tous les lymphocytes), le rituximab (anti-CD20, exprimé par les lymphocytes B), et le daclizumab (anti-CD25, exprimé par les lymphocytes activés et les Tregs). Bien entendu, l'avantage des traitements monoclonaux c'est qu'ils permettent de cibler spécifiquement la molécule à inhiber. L'alemtuzumab a permis de réduire de 75% le taux de poussées et de 65% le risque de progression du handicap chez les patients RR-MS (Coles *et al.*, 2011). Quant au rituximab, une étude sur les patients RR-MS a révélé que ce traitement permettait de réduire de 50% le nombre de poussées annuelles, mais a été cependant associé à des LEMP également (Hauser *et al.*, 2008). Les données sur le daclizumab en SEP sont attendues pour la fin de l'année.

Il y a 4 nouvelles molécules développées pour être administrées par voie orale : l'acide fumaric (immunomodulateur), le laquinimod (immunomodulateur), le teriflunomide (immunomodulateur) et la cladribine (immunosuppresseur). Suite aux résultats encourageants sur la réduction du taux de lésions (52%) sur les patients RR-MS, et l'apparente absence d'effets secondaires nuisibles, le laquinimod a reçu la désignation « Fast Track » de la « US Food and Drug Administration ». Une étude sur 1000 patients RR-MS a débuté en 2009 et les résultats devraient être connus en début 2012.

Finalement, il existe deux thérapies plus exploratoires : le vaccin à ADN codant pour la protéine de MBP et la transplantation de moelle osseuse. Le but du vaccin à ADN est d'induire une réponse tolérogénique de la part du système immunitaire face à la protéine de MBP. Tel que mentionné à la première section de cette thèse, une stimulation répétée et forte des lymphocytes résulte en l'induction de la mort cellulaire et/ou en anergie. En EAE, cette approche s'est avérée très efficace pour inhiber le développement de la maladie (Lobell *et al.*, 1998; Ruiz *et al.*, 1999). Des essais sont en ce moment en cours pour tester son efficacité au sein des patients RR-MS, SP-MS et PP-MS (Ehling *et al.*, 2010). Quant à la transplantation de moelle osseuse, le but ici est de reformer un nouveau système immunitaire par l'injection de cellules hématopoïétiques autologues. En EAE, la radiation totale des souris suivie par la transplantation autologue de cellules hématopoïétiques a permis une amélioration et même la guérison de la maladie en cours (Martino and Pluchino, 2006). Il y a des essais cliniques en cours pour valider ce traitement en SEP. Les patients recrutés sont ceux qui présente une forme avancée de SP-MS ou agressive de RR-MS. Cependant, ce traitement représente le plus risqué de toutes les options avec un taux de mortalité variant de 5 à 10% (Muraro and Bielekova, 2007).

Enfin, il serait difficile d'écrire une section sur les traitements de la SEP sans parler du traitement controversé proposé par le Dr. Paolo Zamboni. Selon le Dr. Zamboni, la SEP serait due à une perturbation de la circulation sanguine, le cerveau et la moelle épinière étant mal irrigués. Le fer s'échapperait des globules rouges du sang demeurant trop longtemps dans le cerveau ce qui provoquerait une réaction auto-immune. Cette thèse serait appuyée par le fait qu'on retrouve du fer dans les lésions de SEP. Ainsi le Dr. Zamboni propose une angioplastie pour remédier au problème. La technique de l'angioplastie par ballonnet telle que proposée aux malades de SEP est en tout point identique à celle qu'on utilise dans le cas d'un infarctus du myocarde. Il s'agit de la mise en place d'une sonde au bout de laquelle se trouve un ballonnet gonflable. Celui-ci une fois installé dans les veines du cou, qui servent à faire évacuer le sang du cerveau vers le cœur, élimine le rétrécissement et rétablit la circulation sanguine (Zamboni *et al.*, 2009a).

Puisque l'hypothèse est audacieuse et va à l'encontre des connaissances actuelles, il y a 2 éléments cruciaux à considérer ici : le premier élément à évaluer c'est de savoir si les patients de SEP ont effectivement des occlusions veineuses en plus grande proportion que le reste de la population; et le second élément à évaluer c'est de savoir si effectivement les dépôts de fer sont à l'origine de la SEP.

Pour répondre au premier élément, Dr. Zamboni a affirmé dans son étude publiée en 2009 que 100% des patients SEP présentaient des problèmes au niveau des veines du cou, alors que 0% des contrôles n'en présentaient (Zamboni *et al.*, 2009b). Cependant plusieurs études subséquentes ont été incapables de démontrer une différence significative entre les patients SEP et les contrôles (Doepf *et al.*, 2010; Krogias *et al.*, 2010; Sundstrom *et al.*, 2010; Wattjes *et al.*, 2011; Yamout *et al.*, 2010), ce qui laisse planer un doute sur l'importance des occlusions veineuses en SEP.

Quant au second élément, il est vrai que l'on retrouve un niveau de fer plus élevé au niveau des lésions de patients SEP et dans les souris EAE (Craelius *et al.*, 1982; Levine and Chakrabarty, 2004). Et avant la venue de la théorie du Dr. Zamboni, il avait été admis que cette accumulation de fer était due à la mort cellulaire des oligodendrocytes qui relâchaient le fer de leurs protéines. Ainsi, il était admis que l'accumulation de fer observée dans les lésions était une conséquence de l'inflammation, et non l'opposé. Il est important de noter que l'accumulation de fer est fréquemment observée dans les désordres neuro-dégénératifs, tels que la maladie de Parkinson et l'Alzheimer (Altamura and Muckenthaler, 2009) sans pour autant qu'il y ait démyélinisation. De plus, les patients ayant des problèmes de circulation sanguine dans le cerveau, tels que ceux souffrant de thrombophlébite cérébrale, ne sont pas plus à risque de développer la SEP (Khan *et al.*, 2010). Ainsi, bien qu'il soit possible que le dépôt de fer puisse participer à la pathologie de la SEP, pour le moment il n'y a aucune démonstration que cet événement soit la cause de la maladie.

Bien qu'intrigante, la proposition du Dr. Zamboni reste pour le moins sans fondement scientifique. Dr. Zamboni a lui-même admis que sa recherche n'était que pilote

et qu'il fallait des études de plus grandes envergures afin de démontrer son hypothèse. Le gouvernement canadien a consenti un budget de 2.4 millions de dollars réparti en 7 groupes de recherches afin d'évaluer le potentiel thérapeutique de cette chirurgie. Malheureusement, l'espoir d'un remède miracle fait courir les foules, et certains patients ont payé le gros prix afin de subir cette opération dans des cliniques privés ou des pays tels que le Costa Rica, la Pologne et l'Inde. Et bien que certains patients aient témoigné une sensation de mieux être général, certains autres patients ont subi de graves complications telles que la formation de caillots, la migration du ballonnet, une hémorragie, des lésions à un nerf crânien et la thrombose cérébrale. Pire, plusieurs décès ont été répertoriés suite à la procédure (Burton *et al.*, 2011; Samson, 2010).

Aujourd'hui, la plus grande partie de la recherche visant un traitement en SEP se concentre sur l'inhibition d'entrée et d'activation dans le SNC des lymphocytes T CD4⁺, et particulièrement, des lymphocytes Th17, tout en permettant l'immuno-surveillance.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

Les effets spectaculaires observés par le natalizumab ont permis d'identifier l'interaction entre les cellules endothéliales de la BHE et les cellules immunitaires comme étant une étape clé dans le développement des lésions de SEP. Ainsi, le défi aujourd'hui est donc d'identifier précisément les molécules des cellules responsables de la maladie ainsi que leur mode de migration pour ne bloquer que l'entrée de celles-ci.

Puisque les connaissances régissant la migration des cellules immunitaires au SNC sont d'ordre général et que très peu d'éléments sont connus au sujet de la migration des lymphocytes T et des CPAs, j'ai donc décidé d'y consacrer la majeure partie de mon doctorat. Ainsi, dans le cadre de mon doctorat, **mon hypothèse générale se résume ainsi** : *la migration des divers sous-types de cellules immunitaires du sang périphérique à travers la BHE est contrôlée par des mécanismes moléculaires distincts et spécifiques à chaque type cellulaire*. Afin de répondre à cette hypothèse, j'ai eu l'opportunité de travailler sur quatre questions fondamentales qui se sont traduites par la réalisation de quatre articles scientifiques

- 1- Quels sont les effets des statines sur la BHE et sur la migration des cellules immunitaires?

Les effets bénéfiques observés en EAE, l'induction d'une réponse Th2 par les lymphocytes T, et l'excellente tolérabilité font de ces molécules des options thérapeutiques attrayantes pour le traitement de la SEP. De plus, il a été démontré que les statines bloquaient efficacement l'interaction entre ICAM-1 et LFA-1 (Kallen *et al.*, 1999; Weitz-Schmidt *et al.*, 2001). Pour cette première étude, nous avons donc émis l'hypothèse que les statines étaient en mesure de réduire la migration des lymphocytes T et des monocytes à travers la BHE. Les données de cette étude sont présentées sous forme d'un article publié dans le journal *Annals of Neurology* (Juillet 2006, Volume 60, pages 45–55) et qui est intitulé « *Statins*

reduce human blood–brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: Relevance to multiple sclerosis ».

2- Quelle est la provenance des CPAs responsables de l'inflammation cérébrale?

L'analyse des lésions de patients SEP démontrent une accumulation importante de lymphocytes T, de macrophages et de DCs. Bien que les microglies résidentes du SNC soient en mesure de se différencier en macrophages suite à un stimulus inflammatoire, la provenance des DCs demeuraient incertaine. Les DCs seraient responsables du transport des peptides de myéline aux organes lymphoïdes secondaires et du phénomène d'« epitope spreading » (McMahon *et al.*, 2005). Et puisqu'il est connu que les monocytes se différencient en DCs suite à leur migration à travers des barrières épithéliales (Chomarat *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 2004) ou endothéliales (Randolph *et al.*, 1998), nous avons émis l'hypothèse qu'en condition inflammatoire, les cellules endothéliales de la BHE fournissent des signaux moléculaires permettant la différenciation des monocytes périphérique en DCs. Les données de cette étude sont présentées sous forme d'un article publié dans le journal *Brain* (Mars 2008, Volume 131, pages 787–799) et qui est intitulé « *The blood–brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells* ».

3- Quel(s) mécanisme(s) les monocytes périphériques utilisent-ils pour migrer à travers la BHE? Et l'inhibition spécifique de la migration des monocytes périphériques permet-elle d'avoir des effets bénéfiques en EAE?

Puisque les CPAs sont cruciaux pour la réactivation des lymphocytes T au SNC, et qu'une grande partie des CPAs retrouvés dans le SNC provenait de la périphérie,

nous avons donc émis l'hypothèse que l'inhibition spécifique de la migration des monocytes au SNC permet d'inhiber l'induction de l'EAE. Une analyse protéomique des membranes des cellules endothéliales de la BHE nous a permis d'identifier Ninjurin-1 comme une nouvelle molécule d'adhérence. Ninjurin-1 se lie de manière homotypique, et nous avons caractérisé l'expression de cette molécule au sein des leucocytes. Les données de cette étude sont présentées sous forme d'un article publié dans le journal *Annals of Neurology* (accepté pour publication en juillet 2011) et qui est intitulé « *Role of Ninjurin-1 in the Migration of Myeloid Cells to CNS Inflammatory Lesions* ».

4- Quels sont les mécanismes de migration des lymphocytes T CD8⁺ à travers la BHE?

L'émergence des LEMP suite au traitement du natalizumab nous laisse croire que la migration des lymphocytes T CD8⁺ serait d'une importance cruciale dans l'immuno-surveillance du SNC. Cependant aucune donnée n'est disponible sur le mécanisme de migration et le phénotype des lymphocytes T CD8⁺ que l'on retrouve dans le SNC. Nous avons émis l'hypothèse que les lymphocytes T CD8⁺ TEM étaient en mesure de migrer à travers la BHE, et que cette migration était en partie médiée par l'intégrine $\alpha 4$. Une fois de plus, les données de cette étude sont présentées sous forme d'un article publié dans le journal *Brain* (accepté pour publication en août 2011) et qui est intitulé « *CNS Recruitment of Effector Memory CD8⁺ T Lymphocytes During Neuroinflammation is Dependent on $\alpha 4$ Integrin* »

RÉSULTATS

Article 1: Statins Reduce Human Blood–Brain Barrier Permeability and Restrict Leukocyte Migration: Relevance to Multiple Sclerosis

Igal Ifergan*, Karolina Wosik*, Romain Cayrol, Hania Kebir, Chantale Auger, Monique Bernard, Alain Bouthillier, Robert Moumdjian, Pierre Duquette, and Alexandre Prat

*Igal Ifergan and Karolina Wosik contributed equally to the work.

Publié dans: Annals of Neurology 2006 July; 60 (1): 45-55

Contributions

Les expériences de migrations ont été réalisées par Chantale Auger et moi-même. Les expériences de diffusion ont été réalisées par moi-même. Les expériences de « RNase protection assays » (RPAs) ont été réalisées par Dr. Karolina Wosik et Romain Cayrol. Les ELISAs ont été effectuées par Hania Kebir, et les FACS par moi-même. Les Western blots sur les jonctions serrées ont été effectués par le Dr. Karolina Wosik. Les cellules endothéliales ont été préparées par Dr. Karolina Wosik, Romain Cayrol, Monique Bernard et moi-même. Les Drs. Alain Bouthillier et Robert Moumdjian nous approvisionnaient en biopsies de cerveaux humains. Dr. Pierre Duquette collaborait dans l'étude en nous envoyant du sang de patient atteint de SEP. Le manuscrit a été écrit par Dr. Alexandre Prat, Dr. Karolina Wosik, Hania Kebir, Romain Cayrol et moi-même

Statins Reduce Human Blood–Brain Barrier Permeability and Restrict Leukocyte Migration: Relevance to Multiple Sclerosis

Igal Ifergan¹, Karolina Wosik¹, Romain Cayrol¹, Hania Kebir¹, Chantale Auger¹, Monique Bernard¹, Alain Bouthillier², Robert Moundjian², Pierre Duquette³, and Alexandre Prat^{1,3}

Note: I.I. and K.W. contributed equally to this work.

¹Neuroimmunology Laboratory, Center for Research on Brain Diseases, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM) Research Center;

²Department of Neurosurgery, CHUM-Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, Canada

³Multiple Sclerosis Clinic, CHUM-Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, Canada.

Corresponding author:

Alexandre Prat, MD PhD

Multiple Sclerosis Clinic and Neuroimmunology Research Unit

CHUM-Notre-Dame Hospital

1560 Sherbrooke Street East, Room Y-3608

Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada.

Phone (514) 890-8000 Ext. 24734

Running Head: Statins and the Human BBB

Figures: 5

Supplemental Figures: 1

Table: 2

Number of characters in the title and running head: 119 and 25 respectively

Abstract word count: 272

Keywords: Multiple sclerosis, blood-brain barrier, statins, transmigration, diapedesis, T lymphocytes, monocytes.

Objective: Dysregulation of the blood-brain barrier (BBB) and transendothelial migration of immune cells are among the earliest central nervous system changes partaking in lesion formation in both multiple sclerosis (MS) and its early clinical form, the clinically isolated syndrome. Evidence for the anti-inflammatory effects of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitors within the central nervous system arose from studies demonstrating that statins improve clinical signs in the animal model of MS and reduce the number of gadolinium-enhancing lesions in MS.

Methods: We sought to describe the impact of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor treatment on the physiology and immunology of human BBB-derived endothelial cells (ECs).

Results: We demonstrate that lovastatin and simvastatin induce a 50 to 60% reduction in the diffusion rates of bovine serum albumin and [¹⁴C]-sucrose across human BBB-ECs *in vitro* through abrogation of isoprenylation processes, but independent of the expression of the tight junction molecules occludin, VE-cadherin, JAM-1, zonula occluden-1, and zonula occluden-2. Simvastatin and lovastatin were equipotent in reducing BBB permeability *in vitro*, with median effective concentration (EC₅₀) of 9.5×10^{-8} and 1.0×10^{-7} M, respectively. We further demonstrate that lovastatin and simvastatin treatment of BBB-ECs significantly restricts the migration of clinically isolated syndrome-derived and MS-derived monocytes and lymphocytes across the human BBB *in vitro*, through a specific reduction in the secretion of the chemokines monocyte chemoattractant protein-1/CCL2 and interferon- γ -inducible protein-10/CXCL10 by BBB-ECs.

Interpretation: Our data parallel the previously reported magnetic resonance imaging-based radiological findings and suggest an effect of statins that could be beneficial in early MS, restricting the diffusion of molecular tracers and the migration of immune cells across the human BBB.

INTRODUCTION

3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors, widely known as “statins,” were introduced in 1987 for the treatment of dyslipidemia; more recently, they were approved to reduce the risk for major coronary events. Although the cardiovascular protective effects of statins are related to the lipid-reducing effect of HMG-CoA reductase blockade, there is overwhelming evidence that statins also exert anti-inflammatory actions that are independent of their lipid-lowering effects¹⁻⁵. These are thought to occur through the inactivation of prenylation pathways involved in Rho and Ras activation, a crucial mechanism of intercellular adhesion molecule (ICAM)-dependent immune cell recruitment through endothelia⁶⁻¹⁰.

The blood–brain barrier (BBB) is a functional structure of central nervous system (CNS) microvessels characterized by the expression of zonula occluden-1 (ZO-1), ZO-2, occludin, and VE-cadherin, which assemble in membrane-associated tight junction (TJ) complexes^{11,12}. These TJ complexes promote barrier formation and restrict the diffusion of cells and molecules from peripheral blood (PB) to the CNS, providing immune privilege and homeostasis to the CNS. One of the earliest immunological events leading to lesion formation in multiple sclerosis (MS) includes BBB transmigration of antigen and nonantigen-specific leukocytes, as well as soluble immunological mediators of injury¹³⁻¹⁶. Evidence for the anti-inflammatory effects of statins within the CNS arose from two seminal studies demonstrating that statins prevent the expression of inducible nitric oxide synthase and the production of tumor necrosis factor- α (TNF- α) and interleukin-6 (IL-6) by rat astrocytes¹⁷, and that statins ameliorate clinical signs of experimental autoimmune encephalomyelitis¹⁸, the animal model of MS. Based on numerous animal studies, the anti-inflammatory effects of statins were also proposed to be mediated through a reduction in ICAM-1 signaling on CNS endothelium^{6,19}, a down-regulation of the secretion of chemokine CCL2 by astrocytes²⁰, a reduction in matrix metalloproteinase-9 secretion by immune cells, an abrogation of IL-6 secretion by immune cells, and the promotion of T helper cell type 2 lymphocyte maturation and survival, at least in experimental autoimmune encephalomyelitis²¹ (reviewed in Menge and colleagues²² and Neuhaus and colleagues¹).

Statins also are known for their ability to potently bind the ICAM-1 counter-receptor leukocyte function antigen-1, a phenomenon that could potentially antagonize leukocyte migration across endothelial cell (EC) monolayers²³⁻²⁵.

Whereas the immunomodulatory effects of statins on immune cells are well characterized, their role on the physiological and immunological characteristics of the human BBB is still largely unresolved. In this study, we elected to evaluate the direct influence of statins on ECs of the human BBB. We demonstrate that the addition of statins to human brain microvascular endothelial cells (HBECs) grown in primary cultures induces a reversible and dose-dependent reduction in the permeability of the BBB to large and small molecular weight tracers. We also show that pretreatment of BBB-ECs with statins selectively reduces the secretion of chemokines monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1)/CCL2 and interferon- γ -inducible protein-10 (IP10)/CXCL10 and decreases transmigration of MS-derived and clinically isolated syndrome (CIS)-derived lymphocytes and monocytes, but not that of healthy control subjects across the BBB, supporting the concept that statins might be beneficial to reduce cell infiltration into the human CNS.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

Simvastatin and lovastatin were purchased as crystalline powder from Calbiochem (VWR Canlab, Mississauga, Ontario, Canada). Before use, statins were converted to open acid form by reconstitution of 50mg in 1ml ethanol, addition of 0.813ml 1N NaOH, and pH adjustment to 7.2 with 1N HCl. At the time of the study, atorvastatin was not available commercially in Canada. Geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP), farnesyl pyrophosphate (FPP), and squalene were purchased from Sigma (Oakville, Ontario, Canada).

Patient Selection

All MS and CIS patients were observed at the CHUM-Notre-Dame Hospital MS Clinic and diagnosed according to McDonald's criteria²⁶. Patient characteristics can be found in Table 1. Informed consent, as approved by the local ethics committee, was given by each patient before blood collection (local ethic approval SL05.022 and 023). PB immune cells used in this study were collected from healthy donors (n = 14), acutely relapsing (AR) MS patients (n = 9), and patients with acute neurological dysfunction secondary to a first demyelinating episode strongly suggestive of MS, namely, CIS patients (n = 8). An acute relapse was defined as the occurrence of a new neurological symptom in a previously clinically confirmed MS patient, with an increase of at least one point on the expanded disability status scale. CIS patients selected for this study had at least five T2-weighted magnetic resonance imaging lesions (on brain scans) and presented one of the following signs/symptoms: optic neuritis (4 patients), transverse myelitis (either complete or partial; 2 patients), internuclear ophthalmoplegia along with long tract (sensory) dysfunction (1 patient), and cerebellar syndrome (1 patient). All MS and CIS patients had positive oligoclonal bands. MS patients and control subjects receiving statins, immunosuppressive, immunomodulatory, or steroid therapy were not enrolled in the study. For CIS and AR-MS patients, blood collection was performed on the day of the clinical assessment and within a maximum of 2 weeks of the first symptom of the current attack.

Human Brain Microvascular Endothelial Cell Isolation and Culture

Human temporal lobe material was obtained from the operating room (by R.M. or A.B. at the CHUM-Notre-Dame Hospital) from 16 patients who underwent surgery for the treatment of intractable temporal lobe epilepsy (June 2004 to September 2005). Informed consent and ethical approval was given before surgery (ethical approval number HD04.046). HBECs were isolated from nonepileptic material (resection path) according to a previously published protocol^{16,27-31}. In brief, meninges were removed and cortical and subcortical white matter material was minced (3mm³), resuspended in pH 7.2 phosphate-buffered saline, and washed several times to remove blood. CNS material was then homogenized using 5 strokes of loose-fitting Dounce homogenizer at 40g and filtered on a 350µm pore size mesh (BSH Thompson, Montreal, Quebec, Canada). Filtrate was then passed twice through a 112µm pore size mesh, collected, and treated with collagenase type IV (2mg/ml; Sigma, Mississauga, Ontario, Canada) for 15 minutes at 37°C. After inactivation with fetal calf serum (Sigma), filtrate was spun down and plated on 0.5% gelatin-coated six-well plates in EC culture media composed of M199 cell culture media (Invitrogen, Burlington, Ontario, Canada) supplemented with 10% fetal calf serum, 20% human normal serum, insulin-transferrin-selenium, and EC growth supplement (all from Sigma) at 37°C in 5% CO₂ atmosphere. Two days after initial plating, wells were washed twice with phosphate-buffered saline to remove nonadherent cells, and fresh media was added. By days 5 to 7, colonies of ECs were visible; by day 20, human brain ECs from the microvessel fraction (<112µm) could be expanded in tissue culture flasks. As demonstrated previously, these cells express factor VIII, von Willebrand factor, Ulex Agglutenens Europaensis (UAE-1) binding sites, and endothelial antigen HT-7, and they are susceptible to TNF-induced CD54 and CD106 upregulation^{29,32}. Furthermore, when treated with astrocyte media, HBECs upregulate expression of TJ molecules ZO-1, ZO-2, and occludin. Stainings for β-tubulin, glial fibrillary acidic protein, and α-myosin were negative, confirming the absence of contaminating neurons, astrocytes, and smooth muscle cells. Occasional CD68-positive cells (microglia) were seen (<1% at passage 2), and their

number decreased with passage, due to their strong adherence to plastic and their non-proliferative nature.

Blood–Brain Barrier Permeability Assay

HBECs grown in primary cultures were used to generate an *in vitro* model of the human BBB, as reported previously^{16,31,33,34}. On day 0, HBECs were plated on gelatin-coated 3µm pore size Boyden chambers (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) at a density of 2×10^4 cells per well in EC culture media and were allowed to grow for 96 hours, in 20% (vol/vol) astrocyte-conditioned media, to reach confluency. The formation of a confluent monolayer was confirmed by hematoxylin and eosin staining. On day 4, HBECs were treated with simvastatin or lovastatin (10^{-9} - 10^{-5} M) or with control vehicle for 24 hours. On day 5, media were replaced, and fluorescein isothiocyanate (FITC)-labeled bovine serum albumin (BSA; 50µg/ml; Invitrogen, CA) and [¹⁴C]-sucrose (250nCi/ml; MP Biomedicals, Aurora, OH) were added to the upper chambers. 50µl aliquots from both upper and lower chambers were collected every hour for 6 hours and then at 24 hours (day 6). Fluorescence intensity and radioactivity were monitored using FL600 microplate fluorescent reader (Biotek, Winooski, VT) and A2100 Packard Instruments liquid scintillation analyzer (Downers Grove, IL). Molecular tracer diffusion representing BBB permeability is calculated using the formula: [BSA lower chamber] X 100/[BSA upper chamber]. Diffusion rate (DR) is defined as diffusion (%) X [tracer]/ time (hours) and is expressed in moles per hour.

In separate experiments, GGPP (10^{-5} M), FPP (10^{-5} M), and squalene (5×10^{-5} M) were added to HBECs grown in Boyden chambers, at the same time as either simvastatin or lovastatin (10^{-7} M), to evaluate the pathway by which statins exert their effects on permeability. Concentrations were selected based on Cafforio and colleagues article³⁵.

Peripheral Blood Immune Cell Isolation and Blood–Brain Barrier Transmigration Assay

Five days before transmigration of immune cells, 2×10^4 HBECs were seeded onto gelatin-coated Boyden chambers as described earlier. On day 4, HBEC monolayers were treated with simvastatin, lovastatin (10^{-5} - 10^{-8} M), or control vehicle for 24 hours. On day 5, 1 hour before immune cell migration, HBEC monolayers were washed three times with phosphate-buffered saline, and fresh media were added to ensure that immune cells would not be in contact with statins.

PB mononuclear cells were obtained from heparinized whole blood using Ficoll density gradient separation (Amersham Biosciences, Baie D'Urfé, Quebec, Canada). CD14 monocytes and CD3 lymphocytes were isolated using the magnetic cell sorting (MACS) isolation columns, according to manufacturer's protocol (Miltenyi, CA). For the migration assay, 10^6 CD14 monocytes or 10^6 CD3 lymphocytes were added to the upper chamber and allowed to migrate for 48 and 24 hours, respectively. Cells that had migrated to the lower chamber were recovered with 0.01M EDTA, stained with trypan blue, and counted using an hemocytometer under the microscope by two individuals blinded to the treatment group. Dead cells were excluded from the total counts of migrated cells (<1% of cells).

Cytokine and Chemokine Determination Assays

Quantitative messenger RNA (mRNA) changes in cytokine and chemokine production by HBECs after treatment with simvastatin (10^{-7} M), lovastatin (10^{-7} M), or control vehicle were analyzed by RNase protection assay (RPA), as described previously¹⁶. In brief, 24 hours after treatment with statins, HBECs were solubilized in TRIZOL (Invitrogen, CA), and RNA was collected according to the manufacturer's protocol. After hybridization of the [³²P]-labeled probe mix with 10 μ g RNA per condition, probe-RNA duplexes were electrophoresed on a denaturing polyacrylamide/urea gel and exposed overnight on Kodak autoradiographic film (Kodak, NY). RPA probe kits used were: hCK-3, -4, and -5 (BD Biosciences, San Jose, CA), which include cytokines TNF- β , LT- β , TNF- α , interferon- γ , transforming growth factor (TGF)- β 1, TGF- β 2, TGF- β 3, IL-3, IL-7, granulocyte-

macrophage colony-stimulating factor, macrophage colony-stimulating factor, granulocyte colony-stimulating factor, IL-6, LIF, SCF, OSM, and chemokines CCL1, CCL2, CCL3, CCL5, CCL4, CXCL8 and CXCL10. Quantitative changes in protein production by HBECs were assessed from culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay (R&D System, Minneapolis, MN), according to manufacturer's protocol.

Flow Cytometric Analysis of Adhesion Molecule Expression

Confluent HBEC cultures were treated with simvastatin or lovastatin as described earlier. HBECs were recovered with cold 0.05% EDTA, and 10^5 cells were incubated in 10% fetal calf serum with 3 μ l of anti-CD54 (ICAM-1), anti-CD106 (vascular cell adhesion molecule [VCAM-1]), anti-E-selectin, or anti-CD90 antibodies (1 μ g/ μ l, all from BD Biosciences) at 4°C for 30 minutes. Cells were washed and fixed in 2% paraformaldehyde. Cell staining was acquired on a BD FACScan and analyzed using the WinMDI program.

Tight Junction Protein Determination by Western Blot

Confluent HBEC cultures were treated with simvastatin or lovastatin 10^{-7} M for 24 hours, as described earlier. HBEC membranes were pelleted by centrifugation and solubilized in sample buffer. A total of 50 μ g of protein was resolved on 6 to 12% sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis gels, transferred to polyvinyl difluoride membranes, and incubated with specific antibodies raised against occludin, ZO-1, ZO-2 (1/250; Zymed, CA), JAM-1, and VE-cadherin (1/500, BD Biosciences). Binding was demonstrated with horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies (1/1,000; Dako, Carpinteria, CA). α -Actin and Coomassie blue staining were used as loading controls.

Statistical Analyses

Statistical analyses were performed using PRISM Graphpad software and included analysis of variance followed by Student's *t* test or Dunnett's post hoc test, depending on the number of comparisons with controls. Only *p* values less than 0.05 were considered statistically significant.

RESULTS

3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Promote a More Impermeable Blood–Brain Barrier In Vitro

HBECs grown *in vitro* to confluency adopt a typical cobblestone appearance and form a semipermeable barrier that partially restricts the diffusion of soluble molecular tracers. We elected to determine the effect of two different HMG-CoA reductase inhibitors, simvastatin and lovastatin, on the permeability of human BBB-ECs grown *in vitro* on permeable inserts. As shown in Figures 1A and B, [^{14}C]-sucrose diffusion across confluent HBEC monolayers occurs at a steady rate reaching a maximum (equilibration) of 99.6% 24 hours after addition of [^{14}C]-sucrose. During the linear phase of the assay, the trans-BBB DR for sucrose, using untreated HBECs was $(27\% \times 250\text{nCi})/6 \text{ hours} = 11.25\text{nCi/hr}$ or 19.1pmol/hr . On addition of 10^{-7} or 10^{-5}M simvastatin on confluent HBEC monolayers, 24 hours before the diffusion assay, we observed a significant reduction in the permeability of HBEC monolayers to [^{14}C]sucrose, with a reduction of DRs to 12 and 7pmol/hr , respectively ($n = 6$ independent experiments, in duplicate, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively). Similarly, 10^{-7} and 10^{-5}M lovastatin reduced the DRs of sucrose across the human BBB to 11 and 7pmol/hr , respectively ($n = 6$ independent experiments, in duplicate, $p < 0.001$ and $p < 0.0001$, respectively). We also measured the time to reach [^{14}C]-sucrose equilibration between the two chambers. We found a significant difference between untreated cells (22.3 ± 0.4 hours) and HBECs treated with 10^{-7}M simvastatin or lovastatin (31.2 ± 1.1 and 30.2 ± 1.0 hours, respectively) or with 10^{-5}M simvastatin or lovastatin (38.7 ± 0.9 and 37.3 ± 1.2 hours, respectively; $n = 3$ independent experiments, in duplicate chambers, $p < 0.01$ for all groups compared with untreated cells, by analysis of variance and Dunnett's post hoc test). Curve-fit regression analysis of the dose–response effects of HMG-CoA reductase inhibitors (Fig 2A) confirmed equal potency of lovastatin and simvastatin, with a reduction of 10.5 and 10.3%, respectively, of the absolute maximal permeability (at 6 hours) and a relative reduction of permeability of 2.45- and 2.39-fold (reduction as compared with controls), or 59.3 and 58.2% reduction, respectively, at a

concentration of 10^{-6} M. The two HMG-CoA reductase inhibitors tested were also similar for the median effective concentration (EC_{50}), with values of 1.0×10^{-7} M for lovastatin and 9.6×10^{-8} M for simvastatin ($n = 10$ independent experiments).

Hydrophilic molecules of different sizes can diffuse across the BBB using either paracellular or transcellular routes. We thus elected to study the diffusion parameters of the large molecular weight tracer FITC-BSA across HBEC monolayers. As shown in Figures 1C and D, although the rate of FITC-BSA diffusion across untreated HBEC monolayers remains in the linear range, the absolute magnitude of FITC-BSA diffusion is lower compared with [14 C]-sucrose. Unfortunately, because FITC-BSA does not have a specific activity (fluorescence unit per mole), pharmacological profiling of the compounds cannot be calculated, but only estimated. Using the initial concentration of FITC-BSA added to the upper chamber ($50\mu\text{g/ml}$), we thus estimated the DR for untreated HBECs to be $0.906\mu\text{g/hr}$ or 13.8 pmol/hr (using BSA molar mass of $6.56 \times 10^4\text{ g/mol}$), which represents 58% of the DR of the small molecular weight tracer sucrose. Preincubation of HBEC monolayers with simvastatin or lovastatin 24 hours before the permeability assay reduced in a dose-dependent manner both the DR of BSA (see Figs 1C, D) and the absolute diffusion of BSA (see Fig 2B). Addition of 10^{-7} and 10^{-5} M simvastatin reduced the DR of BSA to values of 9.2 and 4.8pmol/hr, respectively ($n = 6$ independent experiments, in duplicate, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). Similarly, addition of 10^{-7} and 10^{-5} M lovastatin reduced the DR of BSA to 9.8 and 5.2pmol/hr, respectively ($n = 6$ independent experiments, in duplicate, $p < 0.01$ and $p < 0.001$, respectively). For both HMG-CoA reductase inhibitors, we observed a significant increase in the time to reach equilibration between the chambers. When untreated HBEC monolayers were used, BSA equilibrated after 63.4 ± 1.5 hours, which was significantly longer than for [14 C]-sucrose ($p < 0.001$). Although addition of 10^{-7} M simvastatin and lovastatin increases the time to reach equilibration to 93.3 ± 2.0 and 96.5 ± 1.7 hours, respectively ($p < 0.001$, for both treatments compared with untreated cells, $n = 3$, in duplicate), there was no additional benefit when using a higher concentration of statins (10^{-5} M). Curve-fit regression analysis of the dose-response effects of statins on BSA

diffusion showed EC_{50} values of $9.2 \times 10^{-8}M$ for lovastatin and $8.1 \times 10^{-8}M$ for simvastatin ($n = 10$ independent experiments), which was similar to the values obtained with [^{14}C]-sucrose.

3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Do Not Influence Healthy Donor Immune Cell Migration

To evaluate whether statins could protect the CNS compartment against immune cell infiltration, we sought to evaluate the impact of HMG-CoA reductase inhibitors on the migration of lymphocytes and monocytes across HBEC monolayers. As shown in Figure 3, CD3 lymphocytes derived from the blood of AR-MS and CIS patients migrated more across untreated HBEC monolayers compared with CD3 lymphocytes obtained from healthy donors ($94,000 \pm 4,200$, $91,000 \pm 5,600$, and $24,603 \pm 2,800$ cells, respectively; $p < 0.01$, by Dunnett's post hoc test, for both patient groups compared with healthy donors). Similar results were obtained when CD14 monocytes were migrated across untreated HBECs: Monocytes from healthy donors migrated significantly less than monocytes obtained from AR-MS or CIS patients ($92,600 \pm 6,200$, $265,000 \pm 10,400$, and $237,000 \pm 4,300$ cells, respectively; $p < 0.01$, by Dunnett's post hoc test, for both patient groups compared with healthy donors). As shown in Figure 3, when immune cells obtained from healthy donors were allowed to migrate across HBECs pretreated with 10^{-5} to $10^{-7}M$ lovastatin or simvastatin, no significant change in migration was observed.

3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Restrict the Migration of Multiple Sclerosis- and Clinically Isolated Syndrome-Derived Monocytes and Lymphocytes across the Human Blood-Brain Barrier In Vitro

We and others have previously demonstrated that the rate of migration of monocytes and lymphocytes derived from MS patients was higher than the rate from healthy donors, and that interferon- β and glatiramer acetate therapy decrease the *in vitro* transmigration of immune cells in our assay^{16,31,36}. Pretreatment of HBEC monolayers with simvastatin or lovastatin (10^{-5} - $10^{-8}M$) resulted in a significant reduction in the migration of CD3

lymphocytes obtained from AR-MS and CIS patients ($p < 0.01$, by analysis of variance and Dunnett's post hoc test, both treatments compared with control). This effect was dose-dependent with a threshold effect at 10^{-7} M and a maximum effect at 10^{-5} M. In a similar way, addition of either HMG-CoA reductase inhibitor to HBEC monolayers 24 hours before CD14 cell migration resulted in a significant reduction in the migration of monocytes obtained from both AR-MS and CIS patients ($p < 0.01$, for both treatments). Threshold effect was seen at 10^{-8} M for both simvastatin and lovastatin (data not shown) and reached a maximal effect at 10^{-5} M.

3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Reduce the Secretion of Monocyte Chemotactic Protein-1/CCL2 and Interferon- γ -Inducible Protein-10/CXCL10 by Human Brain Microvascular Endothelial Cells

We and others previously have reported the expression of cytokines and chemokines by HBECs and their role in the recruitment of immune cells to the CNS^{16,29}. As shown in Table 2, treatment of HBEC monolayers with either simvastatin or lovastatin (10^{-7} M) induced a marked reduction of the secretion of the chemokines MCP-1/CCL2 and IP-10/CXCL10, but did not affect the release of IL-8/CXCL8, as measured by enzyme-linked immunosorbent assay. We also found that additional cytokines produced by HBECs, including IL-6, TGF- β , and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, were not affected by HMG-CoA reductase inhibitors (data not shown). To elucidate whether HMG-CoA reductase inhibitors regulate the production of the chemokines MCP-1/CCL2 and IP-10/CXCL10 at the transcriptional level, we performed RPAs to semi-quantitatively assess chemokine mRNA expression by HBECs. As shown in Figure 4, mRNA levels for each of the chemokines and cytokines tested were not significantly affected by HMG-CoA reductase inhibitors ($n = 3$ different experiments, using 3 different HBEC populations).

3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Do Not Alter the Expression of Adhesion Molecules by Human Brain Microvascular Endothelial Cells

Immune cell recruitment across HBECs is controlled in part by the expression of adhesion molecule ICAM-1, and to a lesser extent VCAM-1. We elected to evaluate the influence of simvastatin and lovastatin on the expression of such adhesion molecules by HBECs, using immunostaining and flow cytometry. As shown in Table 2, neither of the two HMG-CoA reductase inhibitors used could significantly alter the mean fluorescence intensity staining of ICAM-1, VCAM-1, E-selectin, and CD90 by HBECs, when used at concentrations (10^{-7} M) that were shown to restrict migration of immune cells ($n = 3$ independent experiments, using HBECs from 3 different sources).

Prenylation Substrates Reverse the Effect of 3Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors on Permeability

To elucidate the pathways that mediate the barrier-promoting effect of statins, we added GGPP (10^{-5} M), FPP (10^{-5} M), or squalene (5×10^{-5} M) to HBEC monolayers at the time of treatment with lovastatin or simvastatin (10^{-7} M), and permeability of cell mono-layers was assessed using FITC-BSA and 14 C-sucrose. As shown in Figure 5, GGPP and FPP abolish the barrier-promoting effects of simvastatin to FITC-BSA and 14 C-sucrose, whereas FPP reverses the barrier-promoting effect of lovastatin to both tracers ($p < 0.05$, simvastatin alone compared with simvastatin with GGPP or FPP and lovastatin alone compared with lovastatin with FPP, for both BSA-FITC and 14 C-sucrose; $n = 2$ independent experiments, using 2 distinct brain EC populations, in duplicate). The effect of GGPP on lovastatin treatment did not reach statistical significance ($p = 0.06$). Conversely, addition of squalene did not impact on the barrier-promoting effect of either statin used, suggesting that these effects of statins are not dependent on the reduced capacity of BBB-ECs to synthesize cholesterol, but rather on the reduced capacity to synthesize isoprenoid metabolites needed to activate intracellular effector molecules, such as small GTPases.

3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors Do Not Impact on the Expression and Localization of the Tight Junction Molecules Occludin and Zonula Occluden-1 in Human Brain Microvascular Endothelial Cells

We resolved to investigate whether alterations in the expression of the TJ proteins occludin, ZO-1, ZO-2, and VE-cadherin by HBECs could account for the change in permeability to cells and molecules induced by HMG-CoA reductase inhibitors. As reported previously, HBECs kept in primary culture retain the capacity to express such markers when grown in the presence of astrocyte-conditioned media³⁴. As shown in Supplementary Figure 1, we found that after treatment with lovastatin or simvastatin (10^{-7} M), there was no change in the expression of occludin, ZO-1, ZO-2, JAM-1, or VE-cadherin when evaluated by Western blot ($n = 3$ independent experiments). Immunocytofluorescent studies performed on HBECs after treatment with simvastatin or lovastatin confirmed that neither drug had detectable effects on the membrane expression and the junctional localization of occludin, ZO-1, ZO-2, JAM-1, and VE-cadherin (data not shown). Changes in BBB permeability induced by statins thus could not be explained by changes in the expression and localization of these three proteins involved in the regulation of BBB permeability.

DISCUSSION

In this study, we used microvascular ECs obtained from surgically resected human brain specimens to model the human BBB *in vitro*. This *in vitro* human assay system allows us to investigate the influence of novel or experimental therapies on the migration of specific subsets of immune cells, as well as on the diffusion of specific molecular tracers across human BBB-derived ECs. This system also has the advantage of allowing us to investigate the mechanism by which immune cells gain access to the CNS, to compare immune cell migration among individuals affected by different diseases, as well as to study the regulatory mechanisms involved in transjunctional permeability. Using this assay system, we confirmed our initial observation that PB immune cells obtained from AR-MS patients migrate faster than cells obtained from healthy volunteers¹⁶. We now further demonstrate that immune cells obtained from patients in the acute phase of CIS migrate significantly faster than those of healthy control subjects and at a rate similar to those of MS patients.

We elected to evaluate the effect of HMG-CoA reductase inhibitors on several distinct parameters of human BBB physiology and immunology. We demonstrate that statins exert profound dose-dependent changes on the permeability of HBEC monolayers to both small and large molecular tracers. We also show that simvastatin and lovastatin are equipotent at promoting a more competent BBB, at least *in vitro* and at doses equivalent to those found in the plasma of simvastatin- and lovastatin-treated patients. In Bellosta and colleagues recent review³⁷, 80mg simvastatin given orally to patients yielded plasma levels of 10 to 100µg/L, equivalent to 5×10^{-8} to 5×10^{-7} M, a concentration comparable with the concentration used in our *in vitro* assays. Furthermore, we demonstrate that these effects of statins are long-lasting, promoting a 50 to 60% reduction in the *trans*-BBB DRs. Barrier-promoting effects of statins were recordable for as long as 90 hours after a single-dose treatment, suggesting that these effects are pharmacologically indirect and that they occur through blockade of isoprenylation pathways, probably affecting the activation of small GTPases, as demonstrated previously in animals^{7,19}. Although interferon- γ was shown to promote BBB integrity *in vitro*³⁸, to our knowledge, statins are the only chemical

nonbiological agents reported to have such important barrier-promoting effects at the level of the human BBB.

However, despite improved levels of *trans*-BBB permeability on treatment with statins, we were not able to demonstrate changes in TJ protein expression or membrane localization. Immunocytofluorescent and semiquantitative protein determination (Western blot) studies performed on HBECs after treatment with simvastatin or lovastatin confirmed that neither drug has a detectable effect on the membrane expression and junctional localization of occludin, JAM-1, VEcadherin, ZO-1, and ZO-2. Further stainings for additional molecules that are known to partake in TJ formation, assembly, or function will be required to explain the effects of statins on the permeability of HBEC monolayers. In addition, it is reported that RhoA and Rac-dependent residue-specific phosphorylation of both integral and membrane-associated TJ proteins impacts on their ability to maintain an impermeable barrier, at least in epithelial cells, but also probably in human ECs³⁹⁻⁴³. In this study, we further demonstrate that the effect of statins on BBB permeability can be prevented by restoring geranylation, as well as farnesylation processes, in BBB-ECs. It is thus possible that HMG-CoA reductase inhibitors, which are known to impede on RhoA activation, could promote TJ protein function via a reduction in phosphorylation and independently of TJ protein expression or membrane localization. This hypothesis needs further investigation and validation.

Our data also demonstrate that statins exert important immunological effects at the level of BBB-ECs. Although we did not observe any influence of statins on the secretion of cytokines by HBECs grown in primary cultures, we demonstrate that they can potentially reduce the secretion of the chemokines MCP-1/CCL2 and IP10/CXCL10, without altering the production of IL-8/ CXCL8. Such a reduction in protein secretion and release is not paralleled by changes in chemokine mRNA levels, suggesting that statins modulate chemokine secretion by altering either the intracellular signaling mechanism involved in chemokine protein translation or the release of chemokines by specific cellular compartments. In any of these two cases, the effect of statins on chemokine release does not affect IL-8 secretion, which, in theory, should have important functional significance for

neutrophil recruitment to the brain, as well as to other peripheral organs. This might explain why, despite such pleiotropic immune effects, statins have not been reported to increase the risk for bacterial infections to the CNS^{2,3,22,44}. Furthermore, our data demonstrate that HMG-CoA reductase inhibitors do not affect *trans*-BBB migration of immune cells obtained from healthy donors, supporting the notion that in an immunologically healthy environment, where chemokine receptor expression on immune cells is regulated, the anti-inflammatory effects of statins are probably not clinically significant. This assumption is supported by the long-term data on the biological/immunological safety of statin treatment in humans.

As relates to the immunobiology of MS, the statin-induced downregulation in chemokine secretion by BBB-ECs correlates with a dose-dependent reduction in the migration of MS-derived CD3 lymphocytes and CD14 monocytes. Using a similar *in vitro* human BBB assay, we previously demonstrated the importance of MCP-1/CCL2 secretion by BBB-ECs and the expression of CCR2 receptors on immune cells in directing the *trans*-BBB migration of lymphocytes and monocytes^{16,27,31,45}. Our initial studies also report that anti-CCR2 antibodies or interferon- β can partially block T-cell migration across HBECs. Our observation tends to confirm the role for MCP-1/CCL2 in the recruitment of mononuclear cells to the human CNS, because the reduction of CCL2/MCP-1 is paralleled by a decreased migration of both lymphocytes and monocytes. Although the MCP-1/CCL2 and IP-10/CXCL10 reduction correlates with a decrease in immune cell migration in our assay, we cannot infer causality because additional molecular mechanisms involved in the process of *trans*-EC migration also could be affected by statins. Interestingly, the anti-migratory effects of HMG-CoA reductase inhibitors reported here are of greater magnitude than those previously reported when using the currently approved immunomodulatory therapies, such as interferon- β or glatiramer acetate.

The effect of statins on the migration of MS-derived lymphocytes could not be explained by a downregulation in adhesion molecule expression. However, it is likely that statins also alter the RhoA-mediated signaling of ICAM-1 in human BBB-ECs, as previously demonstrated using rat brain ECs^{68,46}, and contribute in that way to the anti-

migratory effects observed. However, this hypothesis remains to be tested in our assay system, using human brain-derived ECs. It is unlikely that the previously reported competitive antagonism of statins for leukocyte function antigen-1 expressed by immune cells^{24,25} might account for the observed reduced migration, because immune cells, in our assay, did not come directly in contact with the HMG-CoA reductase inhibitors.

In a small open-label study, simvastatin recently was reported to decrease the mean number of gadolinium-enhancing magnetic resonance imaging lesions by 44% and the total volume of gadolinium-enhancing lesions by 41% in 30 relapsing-remitting MS patients⁴⁷. A larger multicenter placebo-controlled clinical trial currently is being conducted to assess the clinical efficacy of statins in CIS patients. Our current biological-clinical correlative study demonstrates that HMG-CoA reductase inhibitors promote a more competent BBB, at least *in vitro*, and brings additional biological documentation on the anti-inflammatory functions of statins, supporting the notion that statins could be effective in modulating immune cell infiltration in the human CNS.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by a studentship (I.I.) and a fellowship (K.W.) from the Multiple Sclerosis Society of Canada, start-up funds from the CHUM-Research Center (A.P.), the Canadian Foundation for Innovation (A.P.), studentships from the Canadian Institute of Health Research, Neuroinflammation Training Grant initiative (R.C., H.K.), and a Chercheur Boursier Junior I from the Fonds de la Recherche en Sante' du Que'bec, as well as the Donald Paty Career Development Award of the Multiple Sclerosis Society of Canada (A.P.).

REFERENCES

1. Neuhaus O, Stuve O, Archelos JJ, et al. Putative mechanisms of action of statins in multiple sclerosis—comparison to interferon-beta and glatiramer acetate. *J Neurol Sci* 2005;233: 173–177.
2. Stuve O, Youssef S, Steinman L, et al. Statins as potential therapeutic agents in neuroinflammatory disorders. *Curr Opin Neurol* 2003;16:393–401.
3. Weber M, Prod'homme T, Steinman L, et al. Drug insight: using statins to treat neuroinflammatory disease. *Nat Clin Pract Neurol* 2005;1:106–112.
4. Adamson P, Greenwood J. How do statins control neuroinflammation? *Inflamm Res* 2003;52:399–403.
5. Baker D, Adamson P, Greenwood J. Potential of statins for the treatment of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* 2003;2:9–10.
6. Adamson P, Etienne S, Couraud PO, et al. Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J Immunol* 1999;162:2964–2973.
7. Etienne S, Adamson P, Greenwood J, et al. ICAM-1 signaling pathways associated with Rho activation in microvascular brain endothelial cells. *J Immunol* 1998;161:5755–5761.
8. Greenwood J, Walters CE, Pryce G, et al. Lovastatin inhibits brain endothelial cell Rho-mediated lymphocyte migration and attenuates experimental autoimmune encephalomyelitis. *FASEB J* 2003;17:905–907.
9. Greenwood J, Etienne-Manneville S, Adamson P, et al. Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol* 2002;38:315–322.
10. Liu L, Moesner P, Kovach NL, et al. Integrin-dependent leukocyte adhesion involves geranylgeranylated protein(s). *J Biol Chem* 1999;274:33334–33340.

11. Ballabh P, Braun A, Nedergaard M. The blood-brain barrier: an overview: structure, regulation, and clinical implications. *Neurobiol Dis* 2004;16:1–13.
12. Huber JD, Egleton RD, Davis TP. Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier. *Trends Neurosci* 2001;24:719–725.
13. Lassmann H. Neuropathology in multiple sclerosis: new concepts. *Mult Scler* 1998;4:93–98.
14. Owens T, Sriram S. The immunology of multiple sclerosis and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis. *Neurol Clin* 1995;13:51–73.
15. Vos CM, Geurts JJ, Montagne L, et al. Blood-brain barrier alterations in both focal and diffuse abnormalities on postmortem MRI in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 2005;20:953–960.
16. Prat A, Biernacki K, Lavoie JF, et al. Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Arch Neurol* 2002;59:391–397.
17. Pahan K, Sheikh FG, Namboodiri AM, et al. Lovastatin and phenylacetate inhibit the induction of nitric oxide synthase and cytokines in rat primary astrocytes, microglia, and macrophages. *J Clin Invest* 1997;100:2671–2679.
18. Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature* 2002;420:78–84.
19. Walters CE, Pryce G, Hankey DJ, et al. Inhibition of Rho GTPases with protein prenyltransferase inhibitors prevents leukocyte recruitment to the central nervous system and attenuates clinical signs of disease in an animal model of multiple sclerosis. *J Immunol* 2002;168:4087–4094.
20. Romano M, Diomedede L, Sironi M, et al. Inhibition of monocyte chemotactic protein-1 synthesis by statins. *Lab Invest* 2000;80:1095–1100.

21. Nath N, Giri S, Prasad R, et al. Potential targets of 3-hydroxy3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy. *J Immunol* 2004;172:1273–1286.
22. Menge T, Hartung HP, Stuve O. Statins—a cure-all for the brain? *Nat Rev Neurosci* 2005;6:325–331.
23. Frenette PS. Locking a leukocyte integrin with statins. *N Engl J Med* 2001;345:1419–1421.
24. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *Nat Med* 2001;7:687–692.
25. Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Dawson J, et al. Improved lymphocyte function-associated antigen-1 (LFA-1) inhibition by statin derivatives: molecular basis determined by x-ray analysis and monitoring of LFA-1 conformational changes *in vitro* and *ex vivo*. *J Biol Chem* 2004;279:46764–46771.
26. McDonald WI, Compston A, Edan G, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Ann Neurol* 2001;50:121–127.
27. Biernacki K, Prat A, Blain M, et al. Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2001;60:1127–1136.
28. Biernacki K, Antel JP, Blain M, et al. Interferon beta promotes nerve growth factor secretion early in the course of multiple sclerosis. *Arch Neurol* 2005;62:563–568.
29. Prat A, Biernacki K, Wosik K, et al. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 2001;36:145–155.
30. Prat A, Biernacki K, Antel JP. Th1 and Th2 lymphocyte migration across the human BBB is specifically regulated by interferon beta and copolymer-1. *J Autoimmun* 2005;24:119–124.

31. Seguin R, Biernacki K, Rotondo RL, et al. Regulation and functional effects of monocyte migration across human brain-derived endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2003;62: 412–419.
32. Prat A, Biernacki K, Pouly S, et al. Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol* 2000;59:896–906.
33. Alter A, Duddy M, Hebert S, et al. Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *J Immunol* 2003; 170:4497–4505.
34. Biernacki K, Prat A, Blain M, et al. Regulation of cellular and molecular trafficking across human brain endothelial cells by Th1-and Th2-polarized lymphocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 2004;63:223–232.
35. Cafforio P, Dammacco F, Gernone A, et al. Statins activate the mitochondrial pathway of apoptosis in human lymphoblasts and myeloma cells. *Carcinogenesis* 2005;26:883–891.
36. Prat A, Al Asmi A, Duquette P, et al. Lymphocyte migration and multiple sclerosis: relation with disease course and therapy. *Ann Neurol* 1999;46:253–256.
37. Bellosta S, Paoletti R, Corsini A. Safety of statins: focus on clinical pharmacokinetics and drug interactions. *Circulation* 2004;109:III50–III57.
38. Kraus J, Ling AK, Hamm S, et al. Interferon-beta stabilizes barrier characteristics of brain endothelial cells *in vitro*. *Ann Neurol* 2004;56:192–205.
39. Farshori P, Kachar B. Redistribution and phosphorylation of occludin during opening and resealing of tight junctions in cultured epithelial cells. *J Membr Biol* 1999;170:147–156.
40. Hirase T, Staddon JM, Saitou M, et al. Occludin as a possible determinant of tight junction permeability in endothelial cells. *J Cell Sci* 1997;110:1603–1613.
41. Hirase T, Kawashima S, Wong EY, et al. Regulation of tight junction permeability and occludin phosphorylation by Rhoap160ROCK-dependent and -independent mechanisms. *J Biol Chem* 2001;276:10423–10431.

42. Tsukamoto T, Nigam SK. Role of tyrosine phosphorylation in the reassembly of occludin and other tight junction proteins. *Am J Physiol* 1999;276:F737–F750.
43. Wachtel M, Frei K, Ehler E, et al. Occludin proteolysis and increased permeability in endothelial cells through tyrosine phosphatase inhibition. *J Cell Sci* 1999;112:4347–4356.
44. Neuhaus O, Stuve O, Zamvil SS, et al. Are statins a treatment option for multiple sclerosis? *Lancet Neurol* 2004;3:369–371.
45. Alter A, Duddy M, Hebert S, et al. Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *J Immunol* 2003; 170:4497–4505.
46. Greenwood J, Amos CL, Walters CE, et al. Intracellular domain of brain endothelial intercellular adhesion molecule-1 is essential for T lymphocyte-mediated signaling and migration. *J Immunol* 2003;171:2099–2108.
47. Vollmer T, Key L, Durkalski V, et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet* 2004;363: 1607–1608.

Table 1. Blood Donor and Patient Characteristics

Donor	n	Mean age years (range)	Sex ratio (M:F)	EDSS mean (range)	Relapse rate mean in years (range)	Disease duration mean in years (range)	MRI T2 lesions mean number (range)
Healthy donors	14	29.3 (25-37)	0.4 (4:10)	-	-	-	-
AR MS	9	28.0 (21-43)	0.27 (3:10)	2.57 (1-4)	1.55 (1-3/ year)	5.22 (2-12)	16.2 (8-27)
CIS	8	26.7 (19-38)	0.33 (2:6)	2.41 (2-4)	-	-	-

EDSS presented in this table represent disability score at the time of the attack. Abbreviations: AR MS: acutely relapsing multiple sclerosis patients; CIS: clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis; EDSS: expanded disability status score; MRI: magnetic resonance imaging. Description of the clinical manifestation of CIS patients can be found in the methods section.

Table 2. Chemokine Secretion and Adhesion Molecule Expression by Human Brain-Derived Microvascular Endothelial Cells after Treatment by 3-Hydroxy-3-methylglutaryl Coenzyme A Reductase Inhibitors

	CCL2/ MCP-1 (pg/ml)	CXCL10/ IP-10 (pg/ml)	CXCL8/ IL-8 (pg/ml)	CD54/ ICAM-1 (%/MFI)	CD106/ VCAM-1 (%/MFI)	CD62e/ E-selectin (%/MFI)	CD90 (%/MFI)
Untreated HBECs	36,745 ± 1,684	102 ± 20	4,116 ± 686	50/36	3/35	6.5/36	64/55
Simvastatin 10⁻⁷M	20,240 ± 1,054*	22 ± 12*	3,558 ± 806	44/34	2.8/32	5.9/37	57/58
Lovastatin 10⁻⁷M	21,780 ± 802*	15 ± 9*	3,951 ± 705	47/36	2.8/32	7.2/40	59/62

Confluent primary cultures of human brain endothelial cells (HBECs) were treated with Lovastatin or Simvastatin (10⁻⁷M) for 24h in fresh media. Supernatant was collected after 24h and assayed for the production of chemokines by use of commercial enzyme-linked immunosorbant assays (sandwich ELISA), HBECs were immunostained (as described in the methods section) and staining intensity was analyzed by flow cytometry. For chemokine production, corresponding mRNA levels are found in figure 4. MCP-1: monocyte chemoattractant protein-1; IP-10: Interferon gamma inducible protein-10; IL-8: Interleukin-8; /CD54/ICAM-1: intercellular adhesion molecule-1; CD106/VCAM-1: Vascular cell adhesion molecule-1; MFI: Mean fluorescence intensity, as assessed by flow cytometry. n=3 experiments performed in duplicate, using 3 different HBEC cell cultures. *, p<0.05, as compared to untreated HBECs.

Figure 1. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors reduce the permeability of human brain microvascular endothelial cells to small and large molecular tracers.

The effects of simvastatin (A, C) and lovastatin (B, D) on the kinetics of [^{14}C]-sucrose and fluorothioisocyanate-bovine serum albumin (FITC-BSA) diffusion across confluent human brain microvascular endothelial cell (HBEC) monolayers were assessed using Boyden chamber assays. Data show that 24-hour treatment of HBECs with simvastatin 10^{-5}M (triangles) or 10^{-7}M (squares) induce a significant reduction in the diffusion of [^{14}C]-sucrose (A) and FITC-BSA (C) compared with untreated cells (circles) ($p < 0.01$, by analysis of variance). Similarly, 24-hour treatment of HBECs with lovastatin 10^{-5}M (triangles) or 10^{-7}M (squares) resulted in a significant reduction in the diffusion of [^{14}C]-sucrose (B) and FITC-BSA (D) compared with untreated cells (circles) ($p < 0.01$, 10^{-7}M simvastatin or lovastatin vs untreated cells; $p < 0.001$, 10^{-5}M simvastatin or lovastatin vs untreated cells by analysis of variance). Additional kinetic calculations (diffusion rates and time to reach equilibrium) are described in Results ($n = 6$ independent experiments, performed in duplicate and pooled).

Figure 1

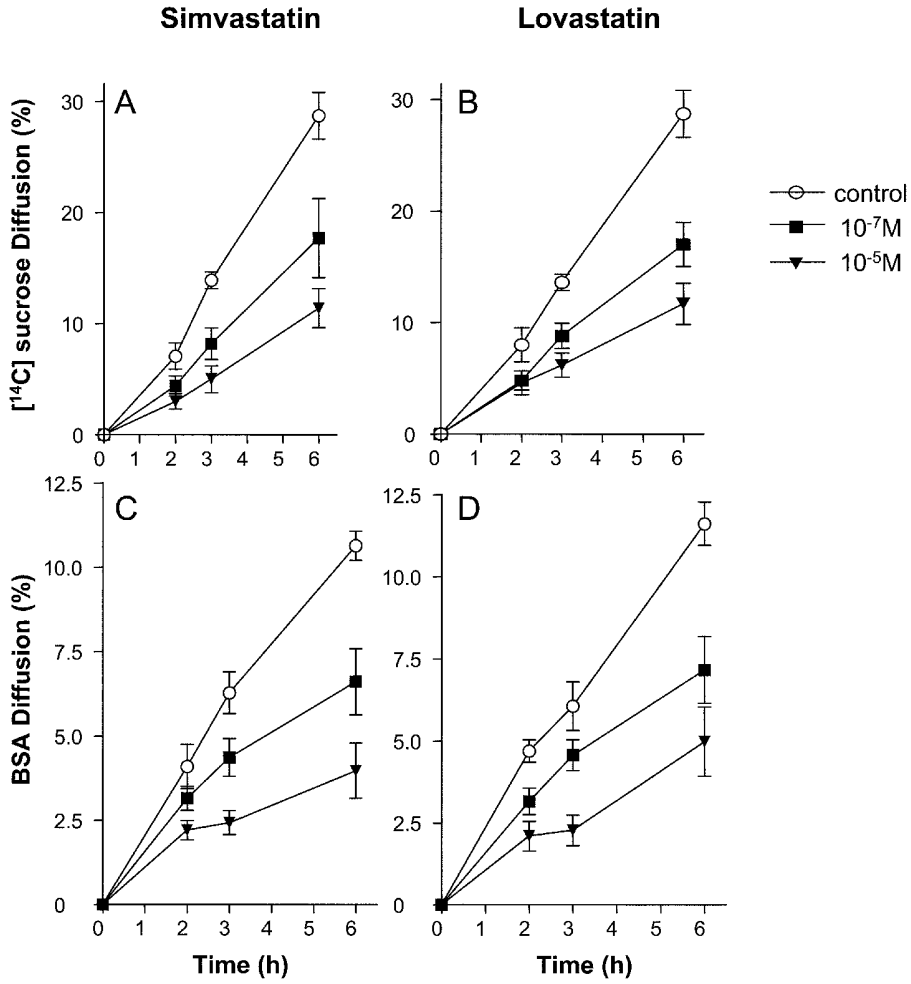


Figure 2. Curve-fit regression analysis of the dose–response effects of 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors on brain endothelial permeability to bovine serum albumin (BSA) and sucrose.

Regression analysis demonstrates that lovastatin (filled squares) and simvastatin (open squares), induce a dose-dependent reduction in the permeability of human brain microvascular endothelial cell (HBEC) monolayers to both BSA (A) and sucrose (B) (59.3 and 58.2% reduction, respectively, at a concentration of 10^{-6} M of either drug; $p < 0.01$ compared with untreated cells by Dunnett's post hoc test). For [14 C]-sucrose diffusion, the two HMG-CoA reductase inhibitors tested were also similar for median effective concentration (EC_{50}), with values of 1.0×10^{-7} M for lovastatin and 9.6×10^{-8} M for simvastatin. The EC_{50} values of lovastatin and simvastatin on BSA diffusion across HBEC monolayers also were not significantly different (9.2×10^{-8} and 8.1×10^{-8} M, respectively) ($n = 10$ independent experiments pooled and performed in duplicate).

Figure 2

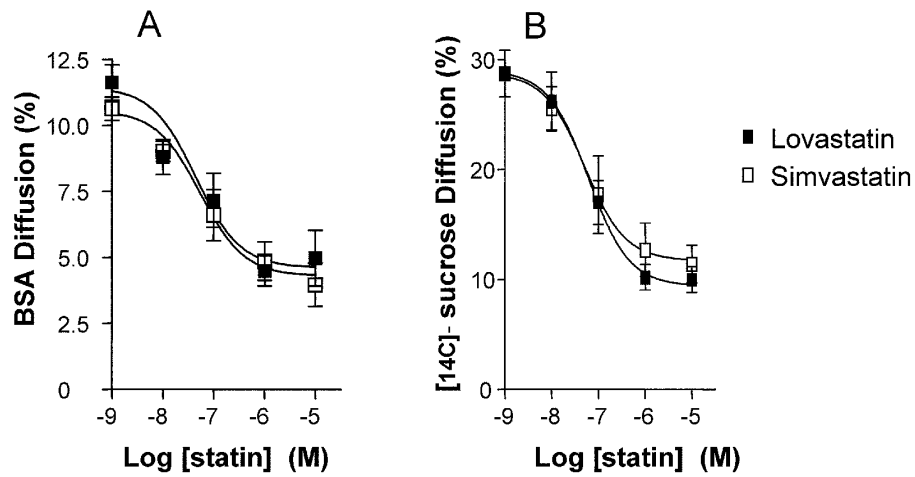


Figure 3. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors restrict the migration of multiple sclerosis– and clinically isolated syndrome (CIS)-derived monocytes and lymphocytes across human brain microvascular endothelial cells (HBECs).

CD3 lymphocytes (bottom) and CD14 monocytes (top) were migrated across HBECs grown to confluency in Boyden chambers. CD3 lymphocytes and CD14 monocytes derived from the blood of acutely relapsing multiple sclerosis (AR-MS) and CIS patients migrated significantly more across untreated HBEC monolayers compared with CD3 lymphocytes or CD14 monocytes obtained from healthy donors ($p < 0.01$, analysis of variance and Dunnett's post hoc test, for both patient groups and both cell types compared with healthy donors). As shown, when immune cells obtained from healthy donors were allowed to migrate across HBECs pretreated with 10^{-5} to 10^{-7} M lovastatin or simvastatin, no significant change in migration was observed. Pretreatment of HBEC monolayers with simvastatin or lovastatin (10^{-5} - 10^{-8} M) 24 hours before migration resulted in a significant reduction in the migration of CD3 lymphocytes obtained from AR-MS and CIS patients ($*p < 0.05$ and $^{\dagger}p < 0.01$, analysis of variance and Dunnett's post hoc test, both treatments compared with control). This effect was dose-dependent with a threshold effect at 10^{-7} M and a maximum effect at 10^{-5} M (data not shown). Addition of either HMG-CoA reductase inhibitors to HBEC monolayers 24 hours before CD14 cell migration resulted in a significant reduction in the migration of monocytes obtained from both AR-MS and CIS patients ($*p < 0.05$ and $^{\dagger}p < 0.01$, for both treatments). Right axis shows the percentage of immune cells that have migrated across HBEC monolayers; left axis shows the absolute number of immune cells that have migrated across the HBEC monolayer. Each point represents the mean from migration studies performed in duplicate; horizontal bars represent the group mean. Patient characteristics are described in Table 1.

Figure 3

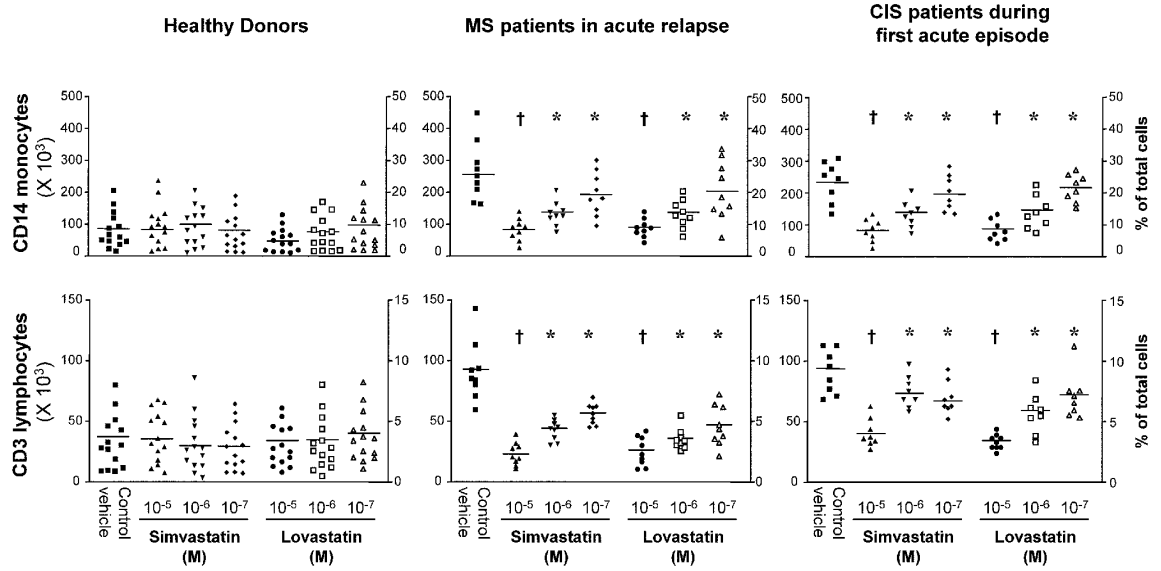


Figure 4. Statin-induced modulation of chemokine release by human brain microvascular endothelial cells (HBECs) does not involve transcriptional regulation of chemokines.

RNase protection assays (RPAs) were performed to assess chemokine and cytokine messenger RNA (mRNA) expression by HBECs. Although 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitor treatment could modulate CCL2/monocyte chemoattractant protein-1 (MCP-1) and CXCL10/interferon- γ -inducible protein-10 (IP-10) protein secretion by HBECs (see Table 2), mRNA levels for each of the chemokines and cytokines tested were not significantly affected by either HMG-CoA reductase inhibitor used ($n = 3$ different experiments, using 3 different HBEC populations).

Lane 1: vehicle-treated HBECs (control);

Lane 2: 10^{-7} M simvastatin;

Lane 3: 10^{-7} M lovastatin.

G-CSF = granulocyte colony-stimulating factor; GM-CSF = granulocyte-macrophage colony-stimulating factor; IL = interleukin; M-CSF = macrophage colony-stimulating factor; MCP = monocyte chemoattractant protein; TGF = transforming growth factor; TNF = tumor necrosis factor.

Figure 4

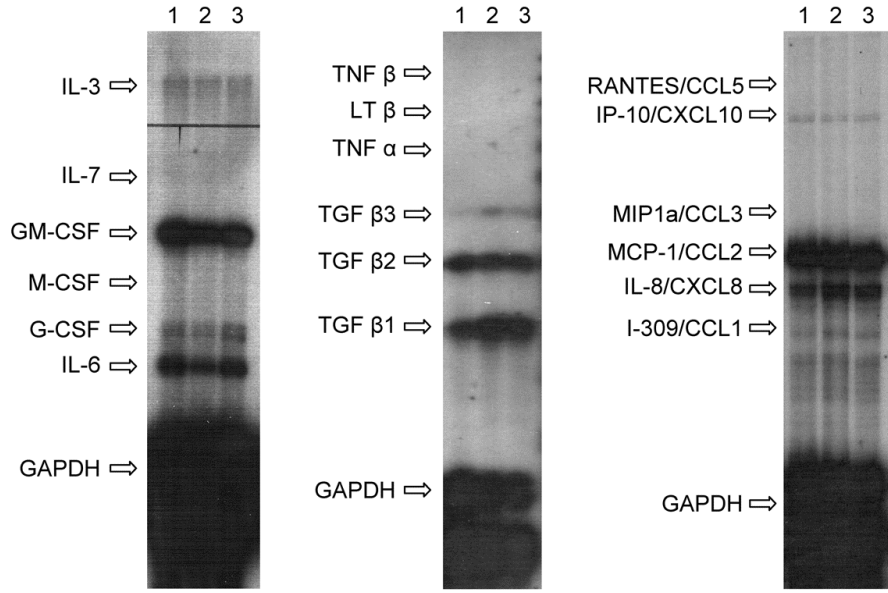
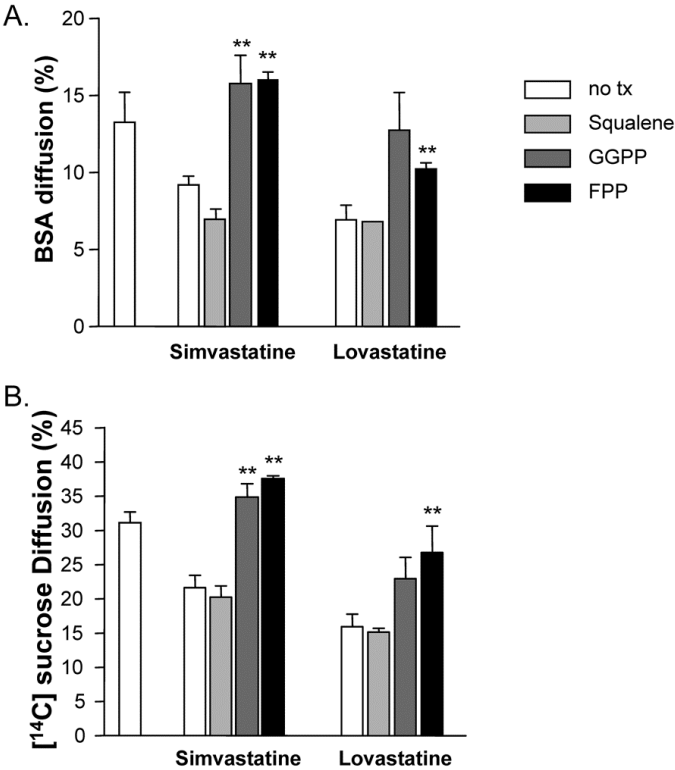


Figure 5. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase promotes human blood–brain barrier (BBB) function through blockade of substrate prenylation.

To assess whether the statin-induced decrease in permeability was due to inhibited cholesterol synthesis or a block in protein isoprenylation, we supplemented confluent human brain microvascular endothelial cell (HBEC) monolayers with squalene ($5 \times 10^{-5}\text{M}$; light gray bars), geranylgeranyl pyrophosphate (GGPP; 10^{-5}M ; dark gray bars), or farnesyl pyrophosphate (FPP; 10^{-5}M ; black bars) at the time of treatment with lovastatin or simvastatin (10^{-7}M ; white bars), and fluorothioisocyanate–bovine serum albumin (FITC-BSA) (A) or [^{14}C]-sucrose (B) diffusion was assessed using the Boyden chamber assay. Data shown represent permeability after 6 hours of diffusion. As before, both simvastatin and lovastatin induce a decrease in permeability compared with untreated cells. Addition of squalene did not reverse the effect of either statin. In contrast, the addition of FPP in conjunction with simvastatin or lovastatin blocks the permeability decreasing effect of either statin, whereas GGPP reverses the effect of simvastatin, for both the large molecular tracer BSA-FITC and the small tracer [^{14}C]-sucrose (** $p < 0.05$, either statin with GGPP or FPP when compared with statin alone; $n = 2$ independent experiments, performed in duplicate on 2 individual blood–brain barrier-endothelial cell populations).

Figure 5



Supplementary Figure 1. 3-Hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A (HMG-CoA) reductase inhibitors do not influence the expression of tight junction proteins in human brain microvascular endothelial cells.

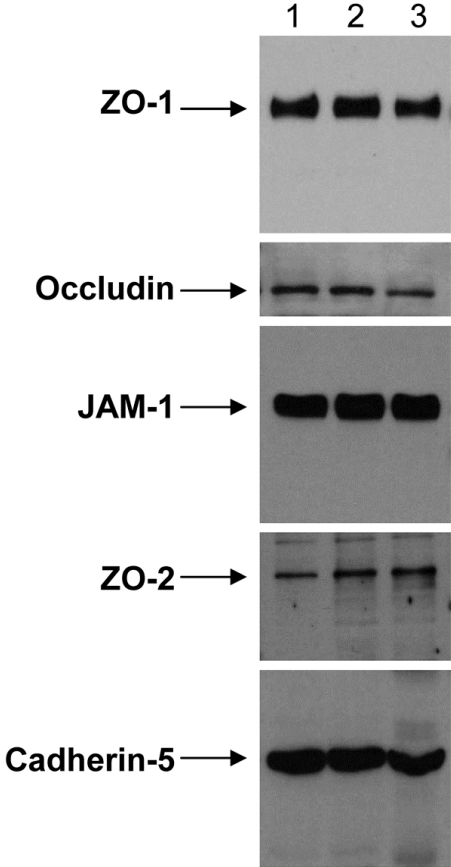
To assess whether the statin-induced decrease in permeability and cell migration was due to a down regulation of tight junction protein expression, confluent human brain microvascular endothelial cell (HBEC) monolayers were treated with Lovastatin or Simvastatin (10^{-7} M) for 24 hours, lysed and assayed by Western blot for the expression of occludin, zonula occludens-1 (ZO-1) and ZO-2, VE-Cadherin and Junctional Adhesion Molecule-1 (JAM-1), using commercially available antibodies. We could not detect changes in the expression of neither of the TJ associated molecules upon treatment with statins. Data shown is representative of 4 different Western blots performed on 3 individual HBECs populations.

Lane 1: Vehicle-treated BBB-ECs;

Lane 2: Simvastatin 10^{-7} M;

Lane 3: Lovastatin 10^{-7} M.

Supplementary Figure 1



Article 2: The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells

Igal Ifergan, Hania Kebir, Monique Bernard, Karolina Wosik, Aurore Dodelet-Devillers, Romain Cayrol, Nathalie Arbour and Alexandre Prat

Publié dans: Brain 2008 March; 131 (Pt 3): 785-99

Contributions

La vaste majorité des expériences ont été effectuée par moi-même. Hania Kebir m'a secondé dans la plupart d'entre elles. En plus, Hania Kebir a effectué les expériences de « RNase protection assays » (RPAs) ainsi que les immunostains sur les coupes de cerveaux humain dans le but de détecter les cellules productrices d'IL-17. Dr. Karolina Wosik a effectué les immunostains sur les tissus humains pour détecter les cellules dendritiques. Monique Bernard m'aidait dans l'isolation des cellules humaines. Les cellules endothéliales ont été préparées par Dr. Karolina Wosik, Romain Cayrol, Monique Bernard, Aurore Dodelet-Devillers, Hania Kebir et moi-même. Et de façon régulière, le Dr. Nathalie Arbour nous donnait son avis scientifique sur le projet. Le manuscrit a été écrit par Dr. Alexandre Prat, Dr. Karolina Wosik, Hania Kebir, et moi-même.

The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells

Igal Ifergan,¹ Hania Kébir,¹ Monique Bernard,¹ Karolina Wosik,¹ Aurore Dodelet-Devillers,¹ Romain Cayrol,¹ Nathalie Arbour¹ and Alexandre Prat¹

¹Neuroimmunology Research Laboratory, Center for the Study of Brain Diseases; CHUM-Hôpital Notre-Dame, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada

Running title: Origin of DCs in the human brain

Abstract word count: 184; Total word count: 6006; Page number: 45;
Figures: 7; Tables: 2

Corresponding author:

Dr Alexandre Prat, MD, PhD.

Department of Medicine (Neurology) and Immunology
MS Clinic and Neuroimmunology Research Laboratory,
CHUM-Hôpital Notre-Dame and CHUM Research Center
Université de Montréal
1560 Sherbrooke East.
Montréal, Québec, Canada
H2L 4M1

Phone: 514-890-8000 ext. 24734

Fax: 514-412-7602

Trafficking of antigen-presenting cells (APCs) into the central nervous system (CNS) is essential for lymphocyte reactivation within the CNS compartment. Although perivascular dendritic cells (DCs) found in CNS inflammatory lesions are reported to polarize naive CD4⁺ T lymphocytes into interleukin (IL)-17-secreting-cells, the origin of those APCs remains controversial. We demonstrate herein that a subset of CD14⁺ monocytes migrate across the inflamed human blood-brain barrier (BBB) and differentiate into CD83⁺CD209⁺ DCs under the influence of BBB-secreted transforming growth factor (TGF)- β and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF). We also demonstrate that these DCs secrete IL-12p70, TGF- β and IL-6 and promote the proliferation and expansion of distinct populations of interferon (IFN)- γ -secreting Th1 and IL-17-secreting Th17 CD4⁺ T lymphocytes. We further confirmed the abundance of such DCs *in situ*, closely associated with microvascular BBB-endothelial cells within acute multiple sclerosis (MS) lesions, as well as a significant number of CD4⁺ IL-17⁺ T lymphocytes in the perivascular infiltrate. Our data support the notion that functional perivascular myeloid CNS DCs arise as a consequence of migration of CD14⁺ monocytes across the human BBB, through the concerted actions of BBB-secreted TGF- β and GM-CSF.

Keywords: blood-brain barrier, dendritic cells, multiple sclerosis, IL-17, CNS

INTRODUCTION

Immune reactions occurring within the central nervous system (CNS) take on a distinctive character given the ability of the blood-brain barrier (BBB) to control passage of leukocytes from the peripheral blood (PB) to the CNS (Pachter *et al.*, 2003)). In addition, the CNS has a limited ability to deploy local immune reactions, likely due to the low basal expression of major histocompatibility complex (MHC) molecules by local antigen-presenting cells (APCs), at least in the context of immune homeostasis. While capillary endothelial cells (ECs) of the BBB are generally regarded as being protective for CNS immune homeostasis, they are the first cells encountered by leukocytes migrating to the brain. Hence, leukocyte interaction with the BBB could represent a crucial step during which the BBB would shape immune responses.

Multiple sclerosis (MS) is a prototypic CNS-directed inflammatory disease characterized by multi-focal perivascular infiltration of mononuclear cells with a relative breakdown in BBB integrity (Sospedra and Martin 2005). In MS and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), disease pathogenesis is attributed to the presence of myelin-reactive T lymphocytes within the parenchyma (Owens and Sriram 1995; Sospedra and Martin 2005). While interferon (IFN)- γ -secreting T lymphocytes (Th1) have long been considered the auto-aggressive and disease-inducing CD4⁺ T lymphocyte subset, recent evidence from EAE studies suggest that interleukin (IL)-17-secreting T lymphocytes (Th17) are responsible for disease initiation (Komiyama *et al.*, 2006; Chen *et al.*, 2006; Cua *et al.*, 2003; Langrish *et al.*, 2005). The cytokine profile of CD4⁺ T lymphocytes is dictated by the ability of APCs to secrete either IL-12p70, favoring Th1 lymphocytes, or conversely the combination of transforming growth factor (TGF)- β and IL-6, favoring a Th17 lymphocyte phenotype. IL-23 (p19/p40) is now recognized as a dendritic cell (DC)-secreted molecule which favors the expansion, rather than the differentiation of Th17 lymphocytes (Mangan *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2006; Bettelli *et al.*, 2006; Veldhoen *et al.*, 2006a).

DCs are considered the most potent APCs. While immature myeloid DCs have the capacity to capture CNS antigen and migrate to secondary lymphoid tissues (de Vos *et al.*, 2002), mature myeloid DCs up-regulate MHC class II, CD80, CD86 and CD40, and acquire the ability to present antigen to naive myelin specific CD4⁺ T lymphocytes, directly in the CNS at the inflammatory site (McMahon *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2007). Karman *et al.* and Serafini *et al.* elegantly demonstrated that mature DCs were involved in CNS immunity and were present in EAE lesions (Karman *et al.*, 2004; Serafini *et al.*, 2000). Using human CNS material, Serafini *et al.* subsequently demonstrated the presence of CD209⁺ DCs in close association with lymphocytes within active MS lesions (Serafini *et al.*, 2006). Moreover, both myeloid (CD11c⁺) and plasmacytoid (CD123⁺) DCs were shown to be enriched in the cerebrospinal fluid of MS patients, especially at the time of acute relapse (Pashenkov *et al.*, 2001).

In non-CNS organs, PB CD14⁺ monocytes are known for their unique ability to differentiate into tissue macrophages or DCs (Fabriek *et al.*, 2005; Randolph *et al.*, 2002; Randolph *et al.*, 1998). This differentiation process depends on characteristics of both the inflammatory milieu they are invading, as well as the epithelial (Zhang *et al.*, 2004; Chomarat *et al.*, 2000) or endothelial (Randolph *et al.*, 1998) barriers they cross to enter the target organ. In the CNS, recent evidence suggest that CD11c⁺ myeloid DCs originate from PB monocytes (Greter *et al.*, 2005) and are required for naive CD4⁺ T cell expansion and for development of EAE lesions (McMahon *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2007; Greter *et al.*, 2005). These CNS perivascular DCs were shown to express CD209 (Greter *et al.*, 2005; Serafini *et al.*, 2006), CD83 (Serafini *et al.*, 2006) and CD11b (Bailey *et al.*, 2007).

Despite histopathological and functional evidence that DCs are involved in lesion formation in EAE, the exact source and functional characteristics of those CNS perivascular DCs remain elusive, especially in humans. In this study, we demonstrate that human BBB-ECs favor the recruitment of PB-derived CD14⁺ monocytes, as well as their differentiation into functional DCs. We show that through secretion of TGF- β and granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF), human BBB-ECs promote the differentiation of a subset of PB CD14⁺ monocytes into CD83⁺ (myeloid) DCs which

express CD209 and secrete IL-12p70, TGF- β and IL-6, favoring the differentiation of distinct CD4⁺ T lymphocyte populations into IFN- γ - or IL-17-secreting cells.

MATERIAL AND METHODS

Isolation and culture of BBB-ECs and astrocytes

CNS tissue was obtained from temporal lobe resection specimens from young adults undergoing surgery for the treatment of intractable epilepsy. Informed consent and ethic approval were given prior to surgery (ethic approval number HD04.046). BBB-ECs were isolated from non-epileptic material according to a published protocol (Biernacki *et al.*, 2001; Prat *et al.*, 2000; Prat *et al.*, 2002). As previously demonstrated, these cells express factor VIII, von Willebrand factor, Ulex Agglutinin Europaeus-1 binding sites, endothelial antigen HT-7; and are susceptible to tumor necrosis factor (TNF)- α -induced CD54 and CD106 up-regulation. Immunoreactivity for glial fibrillary acidic protein and α -myosin could not be detected, confirming the absence of contaminating astrocytes and smooth muscle cells respectively. We also confirmed the absence of monocytes and macrophages by immunostaining with anti-CD14 and anti-CD11c antibodies. BBB-ECs were grown in EC medium composed of M199 (Invitrogen, Burlington, ON, Canada) supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS), 20% normal human serum (HS), EC growth supplement (5 μ g/ml) and insulin-selenium-transferrin premix on 0.5% gelatin-coated tissue culture plates (all reagents from Sigma, Oakville, ON, Canada).

For astrocyte culture, human cerebral hemispheres from fetuses of 17-23 weeks of gestation were obtained from the Human Fetal Tissue Repository (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY) following approved guidelines from the Canadian Institute of Health Research (CIHR). Astrocytes were cultured as previously described (Wosik *et al.*, 2007; Jack *et al.*, 2005) in complete DMEM media (Invitrogen) supplemented with 10% FBS. Astrocyte-conditioned media (ACM) was harvested once a week from confluent flasks and added to the BBB-EC culture media when specified.

Monocyte isolation and culture

Eighty ml venous blood samples were obtained from consenting healthy donors, in accordance with institutional guidelines. PB mononuclear cells (PBMCs) were isolated from EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)-anticoagulated blood using standard Ficoll-

Hypaque (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) density gradient centrifugation. CD14⁺ monocytes were purified from PBMCs using magnetic cell sorting (MACS; Miltenyi Biotec, Toronto, ON, Canada) according to the manufacturer's instructions. Monocyte purity was shown to be >97% as assessed by flow cytometry using anti-CD3- fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD14-R-phycoerythrin (PE) and anti-CD19-PE-Cychrome (Cy) 5 (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada). Monocytes were cultured in RPMI 1640 supplemented with 5% HS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 µg/ml streptomycin (Sigma).

To generate *in vitro* DCs, monocytes were cultured in fresh complete medium supplemented with 1000 U/ml GM-CSF (specific activity 4.5x10⁸ U/mg, BD Biosciences) and 500 U/ml IL-4 (specific activity 1.25x10⁸ U/mg, BD Biosciences). After 6 days, 100 ng/ml lipopolysaccharide (LPS from *Escherichia coli* 0111:B4 lyophilized and sterilized by γ-irradiation; Sigma) was added for 48 h to complete the maturation process.

Migration of CD14⁺ monocytes across BBB-ECs

BBB-ECs grown in primary cultures were used to generate an *in vitro* model of the human BBB, as previously published (Alter *et al.*, 2003; Biernacki *et al.*, 2001). BBB-ECs were plated on gelatin-coated 3 micron pore size Boyden chambers (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) at a density of 2 X 10⁴ cells/well in EC culture media supplemented with 40% (v:v) ACM for 96 h, in order to allow them to reach confluency. The formation of a confluent monolayer was confirmed by hematoxylin-eosin (H&E) staining, as well as soluble tracer diffusion (Ifergan *et al.*, 2006). The media was removed, replaced with fresh EC media and when applicable, supplemented with 40% ACM. Freshly purified human CD14⁺ monocytes were then added to the upper chamber and allowed to migrate for 48 h across BBB-ECs either untreated or pre-activated for 24 h with 100 U/ml IFN-γ (1 U corresponding to 2 ng/ml) and 100 U/ml TNF-α (1 U corresponding to 0.05 ng/ml) (Biosource-Invitrogen, Carlsbad, CA). When applicable, migration experiments were performed in the presence of anti-intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and anti-vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 blocking antibodies (10 µg/ml each), or

neutralizing antibodies against GM-CSF (0.15 $\mu\text{g/ml}$) and/or TGF- $\beta_{1,2,3}$ (0.02 $\mu\text{g/ml}$) (all from R&D Systems, Minneapolis, MN). All antibodies were applied to the upper chamber 30 min prior to the addition of monocytes. After 48 h, three cell subsets were collected. The first subset was composed of monocytes that had completely migrated through the BBB and could be recovered from the lower chamber. The second subset was composed of non-migrated monocytes that were collected by vigorous washes of the BBB-EC monolayer. The third subset was composed of monocytes that had migrated through but were still attached to the BBB-ECs. Those were collected by treating the BBB-ECs with trypsin (Invitrogen) and 2 mM EDTA (Sigma) in order to dissociate the adherent sub-endothelial monocyte population from the BBB-ECs. This third subset was named endothelial-associated DCs (eDCs) and would represent cells that could be detected in the perivascular zone of human CNS. CD83⁺ cells were purified from the BBB-EC-sub-endothelial monocyte mixture using anti-CD83-R-PE antibodies and anti-R-PE immunobeads (MACS; Miltenyi Biotec). Purity of positively selected cells was consistently >97% as confirmed by flow cytometry.

Flow cytometric analyses

Transmigrated and sub-endothelial monocytes (eDCs) (100,000 cells per stain) were incubated with normal mouse IgG (Caltag Laboratories, Burlingame, CA) to prevent non-specific binding of subsequent antibodies. Cells were phenotyped using FITC, PE, PE-Cy5-conjugated antibodies (10 $\mu\text{g/ml}$) specific for human CD1a, CD11c, CD14, CD16, CD40, CD54, CD80, CD83, CD86, CD106, CD123, CD209 (DC-SIGN), human leukocyte antigen (HLA) DR or corresponding isotype controls (all from BD Biosciences). Cells were stained for 30 min at 4°C, washed with phosphate buffered saline (PBS) containing 1% FBS and then fixed in 2% paraformaldehyde (Sigma). Positive cells were acquired on a FACScan and LSRII (BD Biosciences) and analyzed using WinMDI or FACSDiva softwares.

For intracellular cytokine staining (ICS), CD4⁺ lymphocyte and the corresponding APC co-cultures were activated for 18 h with 1 $\mu\text{g/ml}$ ionomycin and 20 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in the presence of 2 $\mu\text{g/ml}$ brefeldin A (Sigma) for the last 6 h

of co-culture. Cells were stained for surface markers and were then fixed and permeabilized in 4% (w/v) paraformaldehyde with 0.1% (w/v) saponin in Hank's Balanced Salt Solution for 10 min at room temperature. Since CD4 is dramatically reduced in ICS assays, we stained for CD45RO and gated cells with this marker. After coculture with eDCs, the percentage of CD45RA⁺ cells was below 10%. Intracellular staining was performed by incubating cells with antibodies against IFN- γ , IL-10 (BD Biosciences) or IL-17 (eBioscience, San Diego, CA) (1 mg/ml) for 30 min on ice in PBS buffer containing 0.1% (w/v) saponin, 1% FBS, 0.1% (w/v) NaN₃, followed by two washes and resuspended in FACS buffer (1% (v/v) FBS, 0.1% (w/v) NaN₃ in PBS). Cells were acquired on a BD LSRII and analyzed using BD FACSDiva software.

Endocytosis assay

Monocytes before migration and eDCs were incubated with 100 μ g/ml of FITC-dextran (molecular weight 40,000, Sigma) for 60 min at 37°C. The endocytosis was stopped by washing the cells three times with cold FACS buffer. After staining with anti-CD11c-PE-Cy5, cells were acquired on a LSRII and analyzed using FACSDiva software. As a control, we also conducted the experiment at 4°C.

RNA isolation and RNase protection assay for cytokine determination

Quantitative mRNA changes in cytokine production by BBB-ECs were analyzed by RNase Protection Assay (RPA), as previously described (Ifergan *et al.*, 2006). In brief, 24 h following treatment, BBB-ECs were lysed in TRIZOL (Invitrogen) and RNA was collected according to the manufacturer's instructions. Following hybridization of the [³²P]-labeled probe mix with 10 μ g of RNA per condition, probe-RNA duplexes were electrophoresed on a denaturing polyacrylamide/urea gel and exposed overnight on a Kodak autoradiographic film. RPA probe kits (hCK-3 and hCK-4, BD Biosciences) included cytokines TNF- β , lymphotoxin (LT)- β , TNF- α , IFN- γ , TGF- β ₁, - β ₂, and - β ₃, IL-3, IL-7, GM-CSF, macrophage colony-stimulating factor (M-CSF), granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF), IL-6, leukemia inhibitory factor, stem cell factor (SCF), and oncostatin-M.

Cytokine determination

Quantitative changes in cytokine production were assessed from culture supernatants by enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) (Pharmingen BD Biosciences), according to the manufacturer's protocol. Plates were read using a Bio-Tek EL800 96-well plate reader at a 450 nm wavelength and analyzed using KC Junior program (Bio-Tek, Mississauga, ON, Canada). Because of the low sensitivity threshold of the available IL-17 ELISA kit, and to better detect differences in IL-17 production between the different APC subsets, APC-T cell co-cultures were stimulated for the last 72 h with 10 $\mu\text{g/ml}$ of anti-human CD3 (clone OKT3; eBioscience). Levels of TGF- β_3 present in serum-containing culture media were subtracted from each value.

Mixed Leukocyte Reaction

Irradiated (3000 rads) CD83⁺ eDCs and migrated CD14⁺ cells were plated into 96-well plates. Allogeneic CD4⁺ T lymphocytes were isolated from PBMCs using CD4 beads (MACS, Miltenyi Biotec) according to the manufacturer's instructions. Purified CD4⁺ T lymphocytes (1×10^5 cells/well) were added to the different APCs at various ratios (5:1; 10:1) and cells were incubated for 5 days in presence of RPMI 1640 supplemented with 5% HS, 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin and 100 $\mu\text{g/ml}$ streptomycin. CD4⁺ T lymphocytes cultured with autologous monocytes in presence or not of phytohemagglutinin (PHA; 2 $\mu\text{g/ml}$, Sigma) were included as internal proliferative controls. One μCi of [³H-methyl]-thymidine (ICN Biomedical Research Products, Costa Mesa, CA) was added to each well, for the last 18 h. Cells were harvested with a cell harvester and counted with a Beta-counter (LKB Wallac, Turku, Finland). Data are expressed as count per min (cpm).

Proliferation was also assessed using the vital dye 5- (and 6-) carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) (Molecular Probes, Eugene, OR). CD4⁺ lymphocytes were resuspended at a concentration of 5×10^6 cells/ml in warm RPMI 1640 and incubated for 10 min at 37°C with 5 μM CFSE. Labeling was quenched with HS. After two washes, cells were resuspended in complete media and put in culture with the isolated APCs for 6

days. Cells were then surface-stained for CD4 as described above and analyzed by flow cytometry.

Immunohistochemistry on human MS brains

Luxol Fast Blue (LFB) and H&E stainings (Wosik *et al.*, 2007) were performed on human brain tissue specimens obtained from four MS patients (autopsy). Post-mortem brain tissue blocks were obtained from the pathology department of the CHUM-Notre-Dame Hospital. Ethic approval has been granted by the CHUM Research Center scientific and ethic committees for brain samples and peripheral blood samples obtained from MS patients, other neurological and non-neurological disease patients for neuroimmunology related studies (BH 07.001). Sections showing acute demyelinating lesions and active perivascular mononuclear cell infiltration were selected (8 to 12 blocks per MS donor), and compared to normal-appearing white matter from the same donors (8 blocks per donor) and to non-neurological disease controls (3 donors; 9-11 blocks per donor). Mean age was 49 ± 6 years and disease duration ranged from 3 to 23 years. The cause of death was pneumonia (2), urosepsis (1) and barbiturate intoxication (1). Paraffin-embedded blocks were cut into 3 μm thick sections and de-paraffinized using standard techniques, as described in Wosik *et al.* 2007. Antigen retrieval was done in sodium citrate (100°C, 20 min). Sections were stained with mouse monoclonal antibodies specific for CD83 (IgG1, 1/100, Serotec, Oxford, U.K.) or CD209 (IgG2b, 1/100, BD Biosciences) for one hour at 4°C. Biotin-conjugated polyclonal rabbit anti-mouse antibody (1/400) was incubated for 30 min and followed by FITC-conjugated streptavidin (1/1000, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) for 30 min. Image acquisition was performed on a Leica DM6000 epifluorescence microscope and analyzed using imageQuant software.

For IL-17 and CD4 immunostainings, frozen CNS material from age- and sex-matched MS patients ($n=4$) and healthy donors ($n=4$, non-neurological disease controls, traumatic death) was obtained after autopsy. Time of death to snap freezing of the blocks varied from 1 to 2.5 h. These blocks are distinct from the paraffin-embedded material used for DC stainings. 10 μm sections were cut, fixed for 20 min in 4% paraformaldehyde and

permeabilized with 1% triton X-100 for 5 min. Sections were blocked with serum for 60 min at room temperature, followed by overnight incubation at 4°C with primary antibodies against IL-17 (1/20, mouse anti-human, eBioscience) and CD4 (1/10, APC-conjugated mouse anti-human, BD Biosciences). After several washes, IL-17 stains were amplified by adding biotin-conjugated goat anti-mouse antibody (1/300) followed by streptavidin-FITC (1/300 for 30 min at room temperature; DakoCytomation). CD4 stains were visualized with rabbit anti-APC antibody (1/100) followed by goat anti-rabbit coupled to Cy3 (1/300, Jackson ImmunoResearch). Nuclei were stained with TO-PRO3 (1/300 in PBS for 15 min, pre-treatment with 100 µg/ml RNase A for 30 min, Molecular Probes). All control stainings were performed omitting the primary antibody, in which case no immunopositive cells could be detected. Staining was visualized using Leica SP5 confocal microscope and analyzed with Leica LAS AF software.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using PRISM Graphpad™ software and included one-way ANOVA (analysis of variance) followed by Student's t-test or Dunnett post-hoc test, depending on the number of comparisons to controls. Only p values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Migration of CD14⁺ monocytes across the human BBB favors a phenotypic change into DC-like APCs

a) Migration of monocytes across resting BBB-ECs

Monocytes have been shown to migrate across human BBB-ECs in response to monocyte chemoattractant protein (MCP)-1/CCL2 produced by BBB-ECs (Seguin *et al.*, 2003). To determine whether the migration process could influence the phenotype of human monocytes, we used the modified Boyden chamber model in which human BBB-ECs separate the upper and lower chambers. From the CD14⁺ monocytes originally seeded on BBB-ECs, 40% failed to migrate after 48 h and 15% transmigrated completely to the lower chamber. These cells retained high expression of CD14 and CD16, and expressed low levels of HLA-DR, CD40, CD83, CD80, CD86 and CD123, as previously published (Seguin *et al.*, 2003) (data not shown). Another population of migrated cells representing ~45% of the initial population seeded on BBB-ECs was identified in the sub-endothelial space, closely associated with BBB-ECs. These cells differed from the migrated (lower chamber) population by their significantly lower expression of CD16 (data not shown) and did not constitute a homogenous population as 5% of cells acquired CD83, CD123, CD209, HLA-DR, CD80, CD86 and CD40, suggestive of a partial DC phenotype (Fig. 1A left panel and Table 1, column untreated BBB-ECs). None of these markers were detected on the PB CD14-selected monocyte population prior to migration. The presence of ACM had no effect on the phenotype (data not shown). Given the sub-endothelial location of this DC-like population, they were named endothelial-associated DCs (eDCs).

b) Migration of monocytes across TNF- α - and IFN- γ -activated BBB-ECs

Using the Boyden chamber migration assay, we next analyzed the phenotype of migrating monocytes, in the context of an inflamed BBB, as would presumably occur during lesion development in MS. Confluent BBB-ECs were cultured overnight in the presence of TNF- α and IFN- γ (both 100 U/ml), two cytokines reported to partake in MS pathogenesis

(Sospedra and Martin 2005) and known to activate ECs (Biernacki *et al.*, 2004; Calabresi *et al.*, 2001). After several washes to remove residual cytokines, CD14⁺ monocytes obtained from healthy donors were added for 48 h on these activated BBB-ECs. Upon migration across IFN- γ - and TNF- α -activated BBB-ECs, a large proportion of sub-endothelial monocytes (namely eDCs) acquired the DC markers CD83 (21%), CD123 (54%), CD209 (40%), HLA-DR (78%), CD80 (76%) and CD86 (88%) (Fig. 1A right panel and Table 1, column activated BBB-ECs), when compared to cells migrated across resting BBB-ECs (Fig. 1A and Table 1, column untreated BBB-ECs). Addition of astrocyte media to ECs did not affect the DC phenotype (data not shown).

As shown in Figure 1B, these eDCs remained in close contact with BBB-ECs and adopted a typical elongated (arrowhead) and ramified (arrow) DC morphology, comparable to DCs generated *in vitro* from PB CD14⁺ monocytes (Fig. 1B). These observations suggest that activated BBB-ECs have the capacity to induce differentiation of PB CD14⁺ monocytes into DCs.

eDCs are potent phagocytes

As DCs are known for their capacity to capture tissue antigens, we tested whether CD83⁺ eDCs have the capacity to phagocytose FITC-labelled dextran. Figure 1C shows that at 37°C, CD83⁺ eDCs collected from the sub-endothelial space have a higher capacity to capture FITC-labelled dextran (open histogram) when compared to *ex vivo* monocytes (shaded histogram), confirming that eDCs behave as traditional DCs ($n=4$). In order to validate this assay, the experiment was also conducted at 4°C. The endocytic activity of eDCs was markedly reduced.

BBB-ECs are potent producers of TGF- β , GM-CSF and IL-6

We elected to identify the soluble mediator(s) secreted by BBB-ECs which could induce monocyte differentiation, looking specifically at molecules that have previously been described to influence the formation of DCs or macrophages *in vitro* (Chen *et al.*, 2002; Zhang *et al.*, 2004; Chomarat *et al.*, 2000). RNA isolated from resting and activated BBB-

ECs were analyzed by RPA. As shown in Figure 2A, an up-regulation of IL-6, TGF- β s, G-CSF and GM-CSF mRNAs was detected upon BBB-EC activation. Equal loading was confirmed by comparable expression of housekeeping genes L32 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) between samples (gels shown are representative of 4 different RPAs using 5 distinct BBB-EC preparations).

We further investigated the cytokines secreted by BBB-ECs in supernatants collected 24 h after inflammatory stimulation. As shown in Figure 2B, a significant up-regulation in the secretion of GM-CSF and TGF- β s by activated BBB-ECs was confirmed at the protein level. However, while levels of IL-6 were high in resting BBB-ECs, they remained unchanged in supernatants from activated BBB-ECs. G-CSF protein could not be detected in activated or resting BBB-EC supernatants.

TGF- β and GM-CSF secreted by BBB-ECs contribute to the differentiation of monocytes into eDCs

To determine whether the increase in GM-CSF and TGF- β secretion by activated BBB-ECs plays a role in the differentiation of PB monocytes into eDCs, we used blocking antibodies directed at GM-CSF and/or TGF- $\beta_{1,2,3}$ during the transmigration assay. As shown in Table 2, simultaneously blocking GM-CSF and TGF- β significantly decreased the number of cells expressing CD83 (from 27% to 7%), CD123 (from 52% to 16%), CD209 (from 43% to 15%) (all, $P < 0.01$). Furthermore, inactivating GM-CSF and TGF- β allowed monocytes to retain CD14 (79% as compared to 19%) while levels of CD11c were unaffected. Surprisingly, the eDC phenotype was not altered when blocking antibodies were tested separately, suggesting that both cytokines are required to achieve monocyte maturation into eDCs (Table 2).

To further determine whether soluble mediators of activated BBB-ECs were sufficient to induce monocyte maturation into eDCs, CD14⁺ monocytes were cultured in the presence of culture media conditioned with TNF- α - and IFN- γ -activated BBB-ECs. Under these experimental culture conditions, we did not observe a change of CD14⁺ monocytes into DC-like cells (data not shown). When migration was performed in the

presence of anti-ICAM-1 and anti-VCAM-1 blocking antibodies, the number of CD14⁺ monocytes that reached the sub-endothelial space was significantly reduced, but still sufficient to allow for phenotypic analysis. When sub-endothelial cells were collected from ICAM-1 and VCAM-1 blocking experiments, we did not observe a phenotypic change of CD14⁺ monocytes into eDCs (Table 2). These results suggest that in our model, contact-mediated mechanisms are also required to induce the phenotypic differentiation of CD14⁺ monocytes into eDCs. Our data hence demonstrate that an activated BBB favors the differentiation and maturation of CD14⁺ monocytes into DCs, through the secretion of GM-CSF and TGF- β , and through yet undetermined contact-dependent mechanisms.

eDCs have the ability to secrete IL-6, IL-12p70 and TGF- β ₁

As cytokines produced by APCs have been shown to play a critical role in modulating multiple immune responses, we analyzed the eDC cytokine profile focusing particularly on cytokines known to induce CD4⁺ Th cell polarization. Purified *ex vivo* CD14⁺ monocytes, migrated CD14⁺ cells and eDCs were assessed for their cytokine secretion by ELISA. As shown in Figure 3, eDCs secreted significantly higher levels of IL-12p70 than *ex vivo* CD14⁺ monocytes and migrated CD14 cells ($P < 0.01$, $n=3$ in duplicate). In addition, eDCs secreted elevated levels of TGF- β ₁ and IL-6, as compared to *ex vivo* CD14⁺ monocytes and migrated CD14 cells ($P < 0.01$, $n=3$ in duplicate). Levels of IL-23 (p19) were below detection for all 3 cell subtypes (data not shown). In these assays, eDCs and monocytes were not stimulated or activated.

eDCs behave as professional APCs

We evaluated the functional capacity of the eDCs to activate PB CD4⁺ T lymphocytes. *Ex vivo* CD14⁺ monocytes, migrated CD14 cells and CD83⁺ eDCs were purified, irradiated and co-cultured for 5 days with allogeneic CD4⁺ T lymphocytes, at various ratios. As shown in Figure 4A, eDCs induced a significant proliferation of allogeneic CD4⁺ T lymphocytes, as assessed by thymidine incorporation, and confirmed by CFSE assay (Fig. 4B). Such eDC-induced proliferation was optimal at a ratio of 1 eDC to 5 CD4⁺ T

lymphocytes and was comparable to the strong proliferative response induced by fresh autologous CD14⁺ monocytes in the presence of PHA (~18,000 cpm; positive control). Stimulation indices comparing proliferation of CD4⁺ T lymphocytes in the absence of APCs (>600 cpm) with CD4⁺ T lymphocytes co-cultured with eDCs were consistently greater than 30 (mean= 42 ± 2.7).

eDCs favor the production of IL-17 or IFN- γ by CD4⁺ T lymphocytes

To determine whether eDCs could promote the polarization of CD4⁺ T lymphocytes, we evaluated, by ICS and ELISA, the cytokine profile of CD4⁺ T lymphocytes after co-culture with allogeneic CD83-expressing eDCs. As shown in Figure 5A, eDCs promoted the expansion of a greater number of IFN- γ -producing Th1 lymphocytes, as compared to migrated CD14 cells and *ex vivo* CD14⁺ monocytes. These results were confirmed by ELISA (Fig. 5B). Furthermore, we noted that CD83⁺eDCs could induce IL-17 production by a distinct subset of CD4⁺ T lymphocytes (29.8 - 31.6% of all CD45RO⁺ T lymphocytes, Fig. 5A), most of which did not express IFN- γ . Only 10% of IL-17⁺ CD45RO⁺ lymphocytes co-expressed IFN- γ . Such IL-17-producing T lymphocytes were undetectable in the co-cultures with migrated CD14 cells and with PHA, probably as a consequence of higher IFN- γ levels (Harrington *et al.*, 2005; Park *et al.*, 2005) or possibly because of high levels of IL-2, as recently reported (Laurence *et al.*, 2007). When eDCs were co-cultured with CD4⁺ T lymphocytes, IL-10 secretion remained low (Figure 5B), and IL-10⁺ CD4⁺ T lymphocytes could not be detected by ICS (Figure 5A). Levels of additional Th2 cytokines (IL-4 and IL-5) were consistently below threshold, when analyzed by ICS or ELISA (data not shown). From these observations, we conclude that CD83⁺eDCs induce CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocyte proliferation, and polarize T cells towards distinct Th17 and Th1 phenotypes, probably depending on their initial differentiation profile.

Presence of eDCs in active and demyelinating MS lesions

To validate the biological and clinical relevance of these *in vitro* observations, we performed *in situ* immunostaining for CD83 and CD209 using four MS brain specimens

showing intense immune cell infiltration within confluent areas of demyelination (by LFB and H&E), two important criteria used to define active MS lesions. As shown in Figure 6, CD83 (upper left panel) and CD209 (upper right panel) immunopositive cells were detected within perivascular cuffs of immune cells in demyelinated areas (2-26 cells per field, mean= 6, in $n=14$ plaques and 25 vessels). CD83⁺ and CD209⁺ DCs exhibited a ramified and elongated morphology, as one would expect for DCs. Such cells could only be seen in infiltrated and demyelinated areas, and were not detected in normal-appearing white matter or chronic inactive plaques (data not shown). We did not observe any difference in the number of DCs, whether there were one or more vessels per plaque. IgG isotype controls are shown in the lower panels.

Infiltrating CD4⁺ T cells express IL-17 in MS lesions

To validate our *in vitro* findings, we performed double immunohistofluorescence staining for CD4 and IL-17 on active MS lesions. While no CD4⁺ T lymphocytes could be detected in CNS material obtained from non-MS controls (traumatic death, Figure 7A left panels), numerous CD4⁺ T lymphocytes (red) expressing IL-17 (green) were seen in active MS lesions ($n= 18$ lesions from 4 MS samples, Figure 7A right panels and Figure 7B).

DISCUSSION

DCs are known as the most potent APCs. Although, they have long been considered to be absent from the animal and human CNS, several groups have recently demonstrated that they play an important role in the development of CNS inflammation in animals (McMahon *et al.*, 2005; Bailey *et al.*, 2007; Karman *et al.*, 2004; Greter *et al.*, 2005) and are present in MS lesions (Serafini *et al.*, 2006; Plumb *et al.*, 2003). While previous reports showed that DCs can migrate across brain ECs and access the CNS *in vivo* (Karman *et al.*, 2004; Karman *et al.*, 2006; Zozulya *et al.*, 2007), our current study supports the notion that perivascular DCs within the human CNS also arise from the migration of a subpopulation of PB monocytes across the inflamed BBB. We further demonstrate that this process is dependent on the secretion of GM-CSF and TGF- β by activated BBB-ECs and provide evidence that such perivascular DCs can induce CD4⁺ T lymphocyte proliferation and polarize cytokine secretion towards either a Th17 or a Th1 phenotype.

Our data demonstrate that upon migration across human BBB-ECs, freshly *ex vivo* and non-manipulated PB CD14⁺ monocytes acquire DC markers and functions. We show that following inflammatory challenge, BBB-ECs up-regulate their secretion of GM-CSF and TGF- β . Both cytokines were also previously shown to be secreted by other CNS cells including astrocytes, oligodendrocytes and microglia, suggesting that additional sources of these cytokines *in situ* can act in a coordinate fashion to promote DC differentiation and possibly maturation (Benveniste 1988; Pratt and McPherson 1997; Malipiero *et al.*, 1990). As regards GM-CSF, elevated levels of this cytokine are known to correlate with the active phase of MS (Carrieri *et al.*, 1998). Moreover, GM-CSF^{-/-} mice are resistant to EAE, display decreased antigen-specific proliferation of splenocytes and fail to sustain immune cell infiltrates in the CNS (McQualter *et al.*, 2001). These observations combined with the current report, suggest that GM-CSF plays a significant role in the development of inflammatory and demyelinating lesions in the CNS. Although the influence of GM-CSF on the differentiation of monocytes into DCs is well established in the periphery, our report is the first to suggest that a similar process can also occur within the human CNS, and more specifically under the influence of the BBB.

TGF- β is widely known for its immunosuppressive and anti-inflammatory effects (Weinberg *et al.*, 1992; Sharma *et al.*, 1996; Santambrogio *et al.*, 1993). Whereas initial EAE studies suggested that increased peripheral TGF- β levels could suppress the disease (Santambrogio *et al.*, 1993; Kuruvilla *et al.*, 1991), more recent studies demonstrate that local TGF- β expression within the CNS parenchyma can enhance immune cell infiltration and augment CNS damage following peripherally-triggered autoimmune responses (Wyss-Coray *et al.*, 1997; Feldmann *et al.*, 1996; Veldhoen *et al.*, 2006b; Li *et al.*, 2007). Furthermore, in conjunction with IL-6 and/or IL-4, TGF- β can induce the differentiation of PB-derived CD34⁺ progenitor cells into Langerhans cells (Ginhoux *et al.*, 2006; Caux *et al.*, 1999; Jaksits *et al.*, 1999; Strobl *et al.*, 1996). In this context, our data explain why most DCs detected within the CNS are closely associated with the BBB, as reported in human CNS-inflammatory diseases, in EAE (Greter *et al.*, 2005; Serafini *et al.*, 2006; Williams *et al.*, 2001; Boven *et al.*, 2000), and in the current study. We believe that the vessel-associated and sub-endothelial CNS DCs, that we call eDCs, differentiate from the migrating PB CD11c⁺CD14⁺ monocytes under the influence of GM-CSF and TGF- β secreted by inflamed BBB-ECs. We also demonstrate that this differentiation process is intimately associated with adhesion and migration, since anti-ICAM-1 or anti-VCAM-1 treatment reduced both monocyte migration and acquisition of DC characteristics. Several groups have already demonstrated the important role of myeloid cell-expressed integrins, such as CD11b (Shi *et al.*, 2004) and CD49d (Puig-Kroger *et al.*, 2000) in the differentiation of monocytes into macrophages or DCs. Data presented in the current study support the notion that integrin-mediated signaling promotes the differentiation and/or maturation of migrating monocytes into more specialized cells such as DCs and confirm the important role for BBB-EC-expressed ICAM-1 and VCAM-1 in this biological process.

In this study, we further demonstrate the presence of CD83⁺, CD209⁺ DCs *in situ*, specifically within active MS lesions. Our data are in agreement with studies published by Aloisi (Serafini *et al.*, 2006) and McQuaid (Plumb *et al.*, 2003), and extend these studies by providing the biological mechanism by which monocytes adopt a DC phenotype upon migration. Although we suspect that perivascular DCs found in MS lesions arise from

migrating PB CD14⁺ monocytes, we cannot exclude the possibility that these DCs would originate from CNS resident cells, such as microglia, or from PB DCs that have gained access to the CNS through the BBB.

Several groups demonstrated that DCs partake into the development of CNS inflammation in animals whether autoimmune (Greter *et al.*, 2005; Plumb *et al.*, 2003; Karman *et al.*, 2004; Serafini *et al.*, 2000) or induced by viruses (Lauterbach *et al.*, 2006). Our report provides evidence that perivascular CD83⁺ CD209⁺ eDCs are able to secrete TGF- β and IL-6, thus favoring the differentiation of CD4⁺ T lymphocytes into IL-17-secreting cells (Th17). Moreover, these eDCs are also able to secrete IL-12 and allow differentiation of CD4⁺ T lymphocytes into IFN- γ -secreting (Th1) cells. These findings are in agreement with previously published studies (Fonteneau *et al.*, 2003; Saint-Vis *et al.*, 1998; Morelli *et al.*, 2001; Bettelli *et al.*, 2006; Weaver *et al.*, 2006; Mangan *et al.*, 2006). Although there is still controversy on the exact phenotype of CD4⁺ T lymphocytes involved in autoimmune CNS inflammatory diseases, especially in human, both Th17 and Th1 lymphocytes have been reported to be implicated in CNS inflammatory lesion formation. In a recent publication, Sallusto's group demonstrated that IL-1 β and IL-6 are required for the differentiation of naive CD4⁺CD45RA⁺ human T cells into Th17 lymphocytes (Acosta-Rodriguez *et al.*, 2007). They also provided evidence that addition of TGF- β prevents the differentiation of naive T lymphocytes into Th17 cells, a phenomenon that was previously reported for Th1 and Th2 lymphocytes (Sad and Mosmann 1994). In the current study, we have used PB CD4⁺ T lymphocytes, containing both CD45RO and CD45RA lymphocytes, to generate Th17 cells upon co-culture with eDCs, and we demonstrate that the vast majority of Th17 lymphocytes are of the CD45RO memory phenotype. We speculate that such a population arises from the initial pool of CD45RO memory lymphocytes, as these cells are more prone to be polarized into Th17 lymphocytes (Kebir *et al.*, 2007).

The *in vitro* and *in situ* data presented in this study, combined with our recent observation that Th1 and Th17 lymphocytes avidly migrate across the human and mouse BBB, suggest that the presence of Th1 and Th17 lymphocytes within the CNS reflects both a preferential migration of these cells across the BBB and their local expansion within the

perivascular space, under the influence of eDCs. Our study provides strong evidence that *in situ* expansion of Th17 lymphocytes can occur directly within the human brain, and expands the initial *in vivo* observations by Greter *et al.* (Greter *et al.*, 2005) and Bailey *et al.* (Bailey *et al.*, 2007) showing that CD11c⁺ perivascular DCs partake in lymphocyte reactivation within the mouse CNS.

By restricting leukocyte migration to the CNS and limiting immune reactions and inflammatory processes occurring within the brain, the BBB has long been considered to promote the CNS immune privileged characteristics. However, this concept has recently been challenged by numerous observations, including the demonstration that 1) BBB-ECs secrete chemokines *in vitro* and *in situ* (Simpson *et al.*, 1998; McManus *et al.*, 1998; Prat *et al.*, 2002; Biernacki *et al.*, 2001), 2) adhesion molecules of the BBB play a critical role in the recruitment of immune cells to the CNS in animals (Archelos *et al.*, 1993; Engelhardt *et al.*, 1998), and 3) anti-very late antigen (VLA)-4 therapy reduces CNS inflammation in humans (O'Connor *et al.*, 2004). These studies, combined with the current report, suggest that although the BBB partakes in CNS homeostasis, it can also shape auto-aggressive immune processes occurring early in the course of CNS inflammation.

ACKNOWLEDGMENTS

This study was supported by the Multiple Sclerosis Society of Canada (MSSC), the Canadian Institute of Health Research (CIHR, MOP-81088) and by the Canadian Foundation for Innovation. I.I., H.K., A.D.-D. and R.C. hold studentships from the MSSC. K.W. holds a fellowship from the MSSC. N.A. holds a CIHR Senior Research Fellowship Phase 2. A.P. is a research scholar from the Fonds de la Recherche en Santé du Québec, and holds the Donald Paty Career Development Award of the MSSC. We thank Janet Laganière for her excellent technical assistance on the confocal microscope and Jack P. Antel for providing assistance and human tissue.

REFERENCES

- Acosta-Rodriguez EV, Napolitani G, Lanzavecchia A, Sallusto F. Interleukins 1beta and 6 but not transforming growth factor-beta are essential for the differentiation of interleukin 17-producing human T helper cells. *Nat.Immunol.* 2007; 8: 942-949.
- Alter A, Duddy M, Hebert S *et al.* Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *J.Immunol.* 2003; 170: 4497-4505.
- Archelos JJ, Jung S, Maurer M *et al.* Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by an antibody to the intercellular adhesion molecule ICAM-1. *Ann.Neurol.* 1993; 34: 145-154.
- Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat.Immunol.* 2007; 8: 172-180.
- Benveniste EN. Lymphokines and monokines in the neuroendocrine system. *Prog.Allergy* 1988; 43: 84-120.
- Betelli E, Carrier Y, Gao W *et al.* Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 2006; 441: 235-238.
- Biernacki K, Prat A, Blain M, Antel JP. Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 2001; 60: 1127-1136.
- Biernacki K, Prat A, Blain M, Antel JP. Regulation of cellular and molecular trafficking across human brain endothelial cells by Th1- and Th2-polarized lymphocytes. *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 2004; 63: 223-232.
- Boven LA, Middel J, Breij EC *et al.* Interactions between HIV-infected monocyte-derived macrophages and human brain microvascular endothelial cells result in increased expression of CC chemokines. *J Neurovirol.* 2000; 6: 382-389.

- Calabresi PA, Prat A, Biernacki K, Rollins J, Antel JP. T lymphocytes conditioned with Interferon beta induce membrane and soluble VCAM on human brain endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 2001; 115: 161-167.
- Carrieri PB, Provitera V, De Rosa T, Tartaglia G, Gorga F, Perrella O. Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. *Immunopharmacol.Immunotoxicol.* 1998; 20: 373-382.
- Caux C, Massacrier C, Dubois B *et al.* Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors. *J Leukoc.Biol* 1999; 66: 781-791.
- Chen Y, Langrish CL, McKenzie B *et al.* Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 2006; 116: 1317-1326.
- Chen Z, Gordon JR, Zhang X, Xiang J. Analysis of the gene expression profiles of immature versus mature bone marrow-derived dendritic cells using DNA arrays. *Biochem.Biophys.Res.Comm.* 2002; 290: 66-72.
- Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat.Immunol.* 2000; 1: 510-514.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 2003; 421: 744-748.
- de Vos AF, van Meurs M, Brok HP *et al.* Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol.* 2002; 169: 5415-5423.
- Engelhardt B, Laschinger M, Schulz M, Samulowitz U, Vestweber D, Hoch G. The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires alpha4-integrin but not alpha4beta7-integrin. *J Clin Invest* 1998; 102: 2096-2105.

- Fabriek BO, van Haastert ES, Galea I *et al.* CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia* 2005; 51: 297-305.
- Feldmann M, Brennan FM, Maini RN. Role of cytokines in rheumatoid arthritis. *Annu.Rev Immunol.* 1996; 14: 397-440.
- Fonteneau JF, Gilliet M, Larsson M *et al.* Activation of influenza virus-specific CD4+ and CD8+ T cells: a new role for plasmacytoid dendritic cells in adaptive immunity. *Blood* 2003; 101: 3520-3526.
- Ginhoux F, Tacke F, Angeli V *et al.* Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat.Immunol.* 2006; 7: 265-273.
- Greter M, Heppner FL, Lemos MP *et al.* Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat.Med.* 2005; 11: 328-334.
- Harrington LE, Hatton RD, Mangan PR *et al.* Interleukin 17-producing CD4(+) effector T cells develop via a lineage distinct from the T helper type 1 and 2 lineages. *Nature Immunology* 2005; 6: 1123-1132.
- Ifergan I, Wosik K, Cayrol R *et al.* Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: relevance to multiple sclerosis. *Ann.Neurol.* 2006; 60: 45-55.
- Jack CS, Arbour N, Manusow J *et al.* TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol.* 2005; 175: 4320-4330.
- Jaksits S, Kriehuber E, Charbonnier AS, Rappersberger K, Stingl G, Maurer D. CD34+ cell-derived CD14+ precursor cells develop into Langerhans cells in a TGF-beta 1-dependent manner. *J Immunol.* 1999; 163: 4869-4877.
- Karman J, Chu HH, Co DO, Seroogy CM, Sandor M, Fabry Z. Dendritic cells amplify T cell-mediated immune responses in the central nervous system. *J Immunol.* 2006; 177: 7750-7760.

- Karman J, Ling C, Sandor M, Fabry Z. Initiation of immune responses in brain is promoted by local dendritic cells. *J Immunol.* 2004; 173: 2353-2361.
- Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I *et al.* Human T(H)17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat.Med.* 2007; 10: 1173-1175..
- Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T *et al.* IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2006; 177: 566-573.
- Kuruvilla AP, Shah R, Hochwald GM, Liggitt HD, Palladino MA, Thorbecke GJ. Protective effect of transforming growth factor beta 1 on experimental autoimmune diseases in mice. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1991; 88: 2918-2921.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM *et al.* IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp.Med.* 2005; 201: 233-240.
- Laurence A, Tato CM, Davidson TS *et al.* Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* 2007; 26: 371-381.
- Lauterbach H, Zuniga EI, Truong P, Oldstone MB, McGavern DB. Adoptive immunotherapy induces CNS dendritic cell recruitment and antigen presentation during clearance of a persistent viral infection. *J Exp.Med.* 2006; 203: 1963-1975.
- Li MO, Wan YY, Flavell RA. T Cell-Produced Transforming Growth Factor-beta1 Controls T Cell Tolerance and Regulates Th1- and Th17-Cell Differentiation. *Immunity.* 2007; 26: 579-591.
- Malipiero UV, Frei K, Fontana A. Production of hemopoietic colony-stimulating factors by astrocytes. *J.Immunol.* 1990; 144: 3816-3821.
- Mangan PR, Harrington LE, O'Quinn DB *et al.* Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage. *Nature* 2006; 441: 231-234.
- McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat.Med.* 2005; 11: 335-339.

- McManus C, Berman JW, Brett FM, Staunton H, Farrell M, Brosnan CF. MCP-1, MCP-2 and MCP-3 expression in multiple sclerosis lesions: an immunohistochemical and in situ hybridization study. *J.Neuroimmunol.* 1998; 86: 20-29.
- McQualter JL, Darwiche R, Ewing C *et al.* Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp.Med.* 2001; 194: 873-882.
- Morelli AE, Zahorchak AF, Larregina AT *et al.* Cytokine production by mouse myeloid dendritic cells in relation to differentiation and terminal maturation induced by lipopolysaccharide or CD40 ligation. *Blood* 2001; 98: 1512-1523.
- O'Connor PW, Goodman A, Willmer-Hulme AJ *et al.* Randomized multicenter trial of natalizumab in acute MS relapses: clinical and MRI effects. *Neurology* 2004; 62: 2038-2043.
- Owens T, Sriram S. The immunology of multiple sclerosis and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis. *Neurol.Clin* 1995; 13: 51-73.
- Pachter JS, de Vries HE, Fabry Z. The blood-brain barrier and its role in immune privilege in the central nervous system. *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 2003; 62: 593-604.
- Park H, Li ZX, Yang XO *et al.* A distinct lineage of CD4 T cells regulates tissue inflammation by producing interleukin 17. *Nature Immunology* 2005; 6: 1133-1141.
- Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Soderstrom M, Link H. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain* 2001; 124: 480-492.
- Plumb J, Armstrong MA, Duddy M, Mirakhur M, McQuaid S. CD83-positive dendritic cells are present in occasional perivascular cuffs in multiple sclerosis lesions. *Mult.Scler.* 2003; 9: 142-147.
- Prat A, Biernacki K, Lavoie JF, Poirier J, Duquette P, Antel JP. Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Arch.Neurol.* 2002; 59: 391-397.

- Prat A, Biernacki K, Pouly S, Nalbantoglu J, Couture R, Antel JP. Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000; 59: 896-906.
- Pratt BM, McPherson JM. TGF-beta in the central nervous system: potential roles in ischemic injury and neurodegenerative diseases. *Cytokine Growth Factor Rev.* 1997; 8: 267-292.
- Puig-Kroger A, Sanz-Rodriguez F, Longo N *et al.* Maturation-dependent expression and function of the CD49d integrin on monocyte-derived human dendritic cells. *J Immunol.* 2000; 165: 4338-4345.
- Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 1998; 282: 480-483.
- Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. The CD16(+) (FcgammaRIII(+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp.Med.* 2002; 196: 517-527.
- Sad S, Mosmann TR. Single IL-2-secreting precursor CD4 T cell can develop into either Th1 or Th2 cytokine secretion phenotype. *J Immunol.* 1994; 153: 3514-3522.
- Saint-Vis B, Fugier-Vivier I, Massacrier C *et al.* The cytokine profile expressed by human dendritic cells is dependent on cell subtype and mode of activation. *J Immunol.* 1998; 160: 1666-1676.
- Santambrogio L, Hochwald GM, Saxena B *et al.* Studies on the mechanisms by which transforming growth factor-beta (TGF-beta) protects against allergic encephalomyelitis. Antagonism between TGF-beta and tumor necrosis factor. *J Immunol.* 1993; 151: 1116-1127.
- Seguin R, Biernacki K, Rotondo RL, Prat A, Antel JP. Regulation and functional effects of monocyte migration across human brain-derived endothelial cells. *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 2003; 62: 412-419.

- Serafini B, Columba-Cabezas S, Di Rosa F, Aloisi F. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am.J Pathol.* 2000; 157: 1991-2002.
- Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R *et al.* Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J Neuropathol.Exp.Neurol.* 2006; 65: 124-141.
- Sharma K, Jin Y, Guo J, Ziyadeh FN. Neutralization of TGF-beta by anti-TGF-beta antibody attenuates kidney hypertrophy and the enhanced extracellular matrix gene expression in STZ-induced diabetic mice. *Diabetes* 1996; 45: 522-530.
- Shi C, Zhang X, Chen Z *et al.* Integrin engagement regulates monocyte differentiation through the forkhead transcription factor Foxp1. *J Clin Invest* 2004; 114: 408-418.
- Simpson JE, Newcombe J, Cuzner ML, Woodroffe MN. Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta-chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J Neuroimmunol.* 1998; 84: 238-249.
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *Annu.Rev Immunol.* 2005; 23: 683-747.
- Strobl H, Riedl E, Scheinecker C *et al.* TGF-beta 1 promotes in vitro development of dendritic cells from CD34+ hemopoietic progenitors. *J Immunol.* 1996; 157: 1499-1507.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Atkins CJ, Locksley RM, Stockinger B. TGF beta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells. *Immunity* 2006a; 24: 179-189.
- Veldhoen M, Hocking RJ, Flavell RA, Stockinger B. Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat.Immunol.* 2006b; 7: 1151-1156.
- Weaver CT, Harrington LE, Mangan PR, Gavrieli M, Murphy KM. Th17: an effector CD4 T cell lineage with regulatory T cell ties. *Immunity.* 2006; 24: 677-688.

- Weinberg AD, Whitham R, Swain SL *et al.* Transforming growth factor-beta enhances the in vivo effector function and memory phenotype of antigen-specific T helper cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 1992; 148: 2109-2117.
- Williams KC, Corey S, Westmoreland SV *et al.* Perivascular macrophages are the primary cell type productively infected by simian immunodeficiency virus in the brains of macaques: implications for the neuropathogenesis of AIDS. *J Exp.Med.* 2001; 193: 905-915.
- Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A *et al.* Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci.* 2007; 27: 9032-9042.
- Wyss-Coray T, Borrow P, Brooker MJ, Mucke L. Astroglial overproduction of TGF-beta 1 enhances inflammatory central nervous system disease in transgenic mice. *J Neuroimmunol.* 1997; 77: 45-50.
- Zhang M, Tang H, Guo Z *et al.* Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat.Immunol.* 2004; 5: 1124-1133.
- Zozulya AL, Reinke E, Baiu DC, Karman J, Sandor M, Fabry Z. Dendritic cell transmigration through brain microvessel endothelium is regulated by MIP-1alpha chemokine and matrix metalloproteinases. *J Immunol.* 2007; 178: 520-529.

Table 1: Dendritic cell markers are expressed on peripheral blood monocytes after migration through activated human BBB-ECs

Marker	Phenotype of sub-endothelial monocytes recovered from (% \pm SEM)	
	Untreated BBB-ECs	Activated BBB-ECs
CD14	76 \pm 1	27 \pm 2*
CD11c	78 \pm 5	74 \pm 12
CD83	5 \pm 2	21 \pm 6*
CD123	8 \pm 3	54 \pm 8*
CD209	4 \pm 3	40 \pm 9*
CD40	2 \pm 1	69 \pm 8*
CD80	4 \pm 1	76 \pm 11*
CD86	24 \pm 4	88 \pm 13*
HLA-DR	76 \pm 4	78 \pm 11

Ex vivo CD14⁺ PB monocytes were allowed to migrate across BBB-ECs, either untreated or pre-treated for 18 h with TNF- α and IFN- γ (100 U/ml). Sub-endothelial monocytes were collected and DC marker expression was assessed by flow cytometry. Data presented are mean (percentage of cells expressing the specific markers) of 9 independent experiments \pm SEM. *, $P < 0.01$, untreated BBB-ECs vs. activated BBB-ECs.

Table 2: Neutralization of GM-CSF and TGF- $\beta_{1,2,3}$ inhibits differentiation of monocytes into endothelial-associated DCs (eDCs)

Marker	Phenotype of eDCs recovered from BBB-ECs treated with (% \pm SEM)					
	Control (Isotype)	α -ICAM- 1	α -VCAM- 1	α -GM- CSF	α -TGF- $\beta_{1,2,3}$	α -GM-CSF and α -TGF- $\beta_{1,2,3}$
CD14	19 \pm 1	74 \pm 5 *	66 \pm 4 *	32 \pm 5	35 \pm 3	79 \pm 6 *
CD11c	71 \pm 14	82 \pm 11	84 \pm 12	75 \pm 2	74 \pm 3	79 \pm 15
CD83	27 \pm 7	5 \pm 2 *	6 \pm 2 *	23 \pm 4	18 \pm 4	7 \pm 4 *
CD123	52 \pm 7	22 \pm 4 *	34 \pm 6	38 \pm 3	51 \pm 6	16 \pm 6 *
CD209	43 \pm 13	1 \pm 0 *	1 \pm 0 *	41 \pm 5	45 \pm 6	15 \pm 3 *

Activated BBB-ECs were treated with blocking antibodies (α) against ICAM-1, VCAM-1, GM-CSF and/or TGF- $\beta_{1,2,3}$ prior to the addition of PB *ex vivo* CD14⁺ monocytes. Data shown represent the mean (percentage of cells expressing the specific markers) from 5 independent experiments \pm SEM. *, $P < 0.01$, each treatment column was compared to the control (isotype).

Figure 1. A population of endothelial-associated DCs (eDCs) arises from transmigration of peripheral blood monocytes across activated blood-brain barrier endothelium.

(A) Human blood-brain barrier-endothelial cells (BBB-ECs) were activated with IFN- γ and TNF- α (100 U/ml) for 18 h, and *ex vivo* human CD14⁺ monocytes were then plated on activated ECs and allowed to migrate for 48 h. Following migration across activated human BBB-ECs, monocytes collected from the sub-endothelial space acquired a DC-like phenotype expressing CD83, CD123 and CD209 markers, and up-regulating CD80, CD86, CD11c, HLA-DR and CD40 (right column). DC markers were absent on monocytes which were collected from the sub-endothelial space following migration through untreated BBB-ECs (left column). Data shown are representative of 9 independent experiments obtained from 9 distinct healthy blood donors on 5 distinct BBB-EC preparations. (B) Photomicrographs of monocytes cultured for 48 h with activated BBB-ECs. After migration, sub-endothelial cells (eDCs, top two micrographs) display an elongated (arrowhead) or ramified (arrow) morphology, typical of DCs and similar to DCs generated *in vitro* (*in vitro* DCs, lower two micrographs) with GM-CSF, IL-4 and LPS (Magnification 400 X). (C) CD83⁺ eDCs (open histograms) have a greater capacity for endocytosis of FITC-dextran, as compared to *ex vivo* monocytes (shaded histograms). Endocytosis was completely inhibited at 4°C. Data shown are representative of 4 independent experiments.

Figure 1

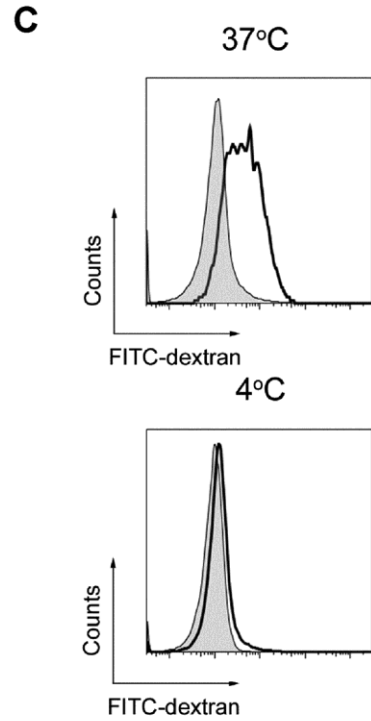
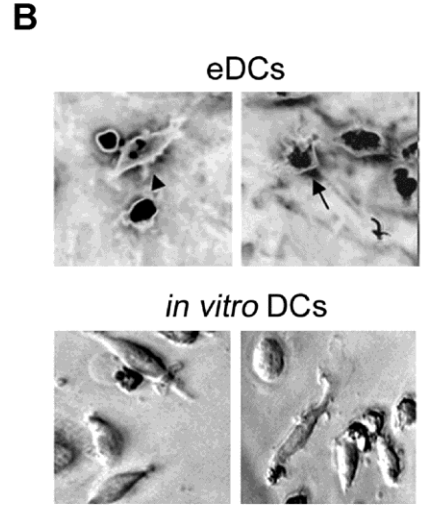
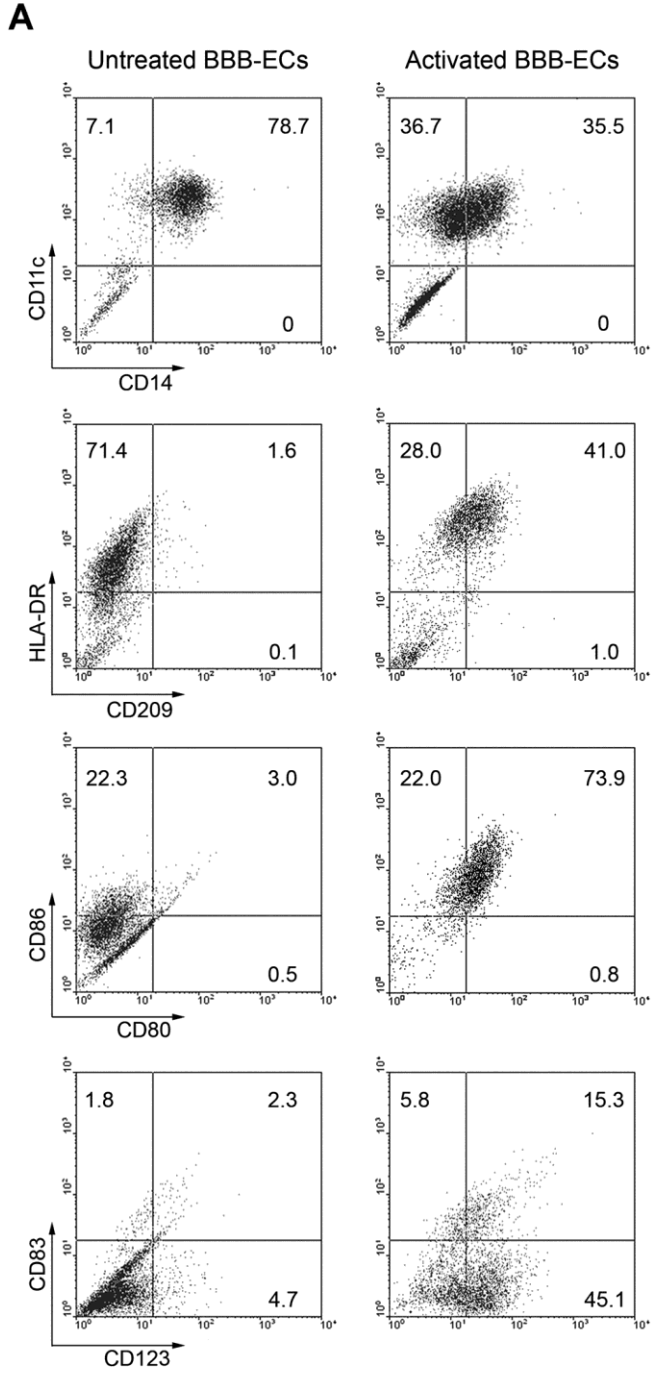


Figure 2. Activated blood-brain barrier-endothelial cells up-regulate GM-CSF and TGF- $\beta_{1,2,3}$.

(A) RNase protection assay of mRNAs collected from untreated and IFN- γ - and TNF- α -activated blood-brain barrier-endothelial cells (BBB-ECs). RNA analyses show an up-regulation of GM-CSF, IL-6, G-CSF and TGF- $\beta_{1,2,3}$ upon inflammatory stimulus. Gels shown are representative of 4 independent experiments. (B) Supernatants collected from BBB-ECs either untreated or activated with IFN- γ and TNF- α (100 U/ml) were tested by ELISA for GM-CSF, TGF- $\beta_{1,2,3}$, IL-6 and G-CSF. Protein levels of TGF- β s and GM-CSF are up-regulated in supernatants from activated BBB-ECs. Levels of IL-6 remained unchanged. G-CSF was not detectable. Levels of TGF- β represent raw values minus basal levels found in serum-containing culture media. Results are expressed as mean \pm SEM of 6 independent experiments, performed in duplicate. *, $P < 0.01$, untreated BBB-ECs vs. activated BBB-ECs.

Figure 2

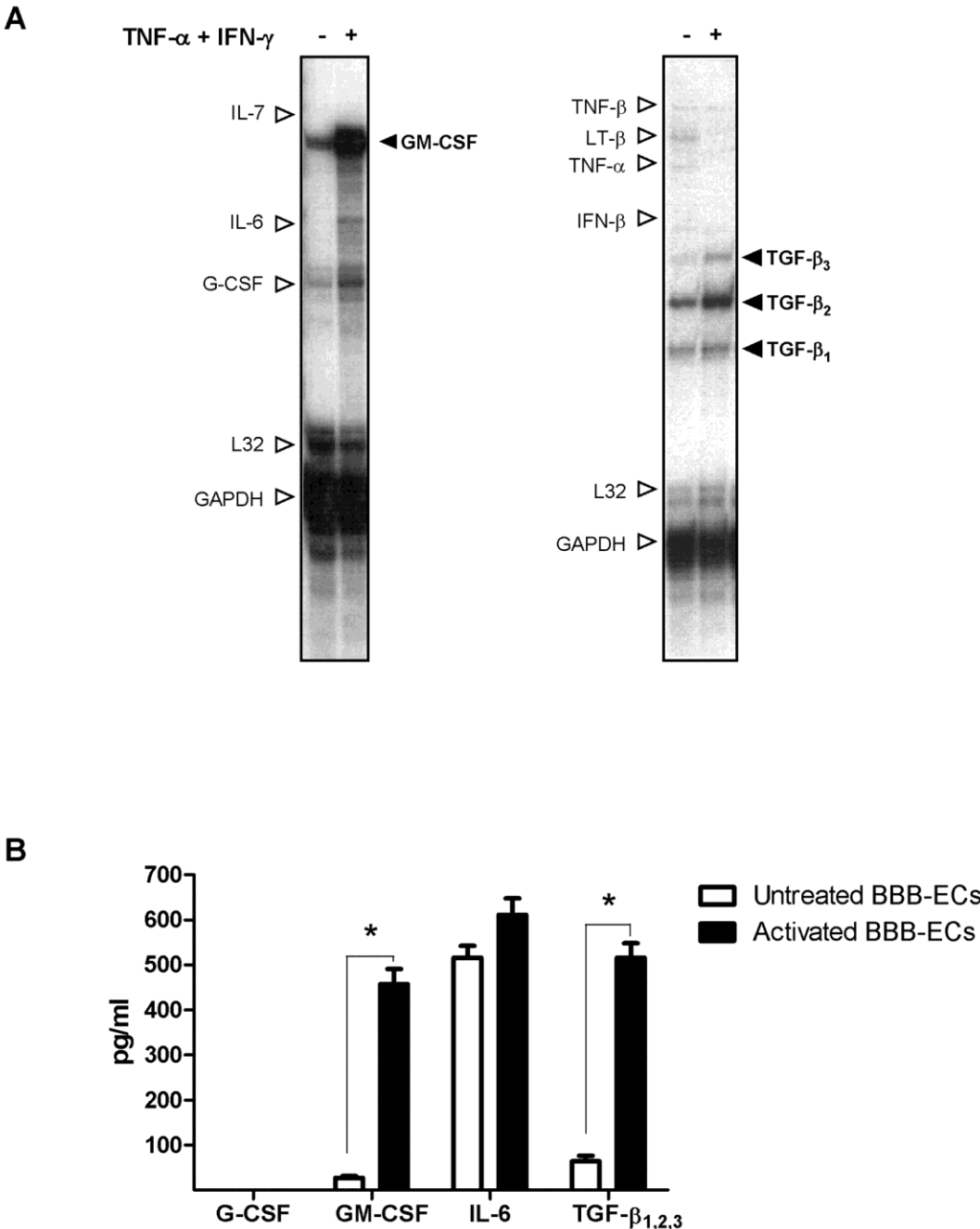


Figure 3. CD83⁺ eDCs are potent producers of IL-6, IL-12p70 and TGF- β ₁.

CD83⁺ eDCs were isolated following migration through activated blood-brain barrier-endothelial cells (BBB-ECs). *Ex vivo* CD14⁺ monocytes, migrated monocytes and CD83⁺ eDCs were cultured in fresh media without supplementation or activation for 24 h. Supernatants were collected and tested by ELISA for IL-12p70, IL-23p19, TGF- β ₁ and IL-6. CD83⁺ eDCs produce significantly higher levels of TGF- β ₁, IL-6 and IL-12p70 than *ex vivo* monocytes and migrated monocytes. Levels of TGF- β ₁ represent raw values minus basal levels found in serum-containing culture media. IL-23p19 remained undetectable in all supernatants tested. Data shown are representative of three independent experiments conducted in duplicate. Error bars represent the SEM, *, $P < 0.01$.

Figure 3

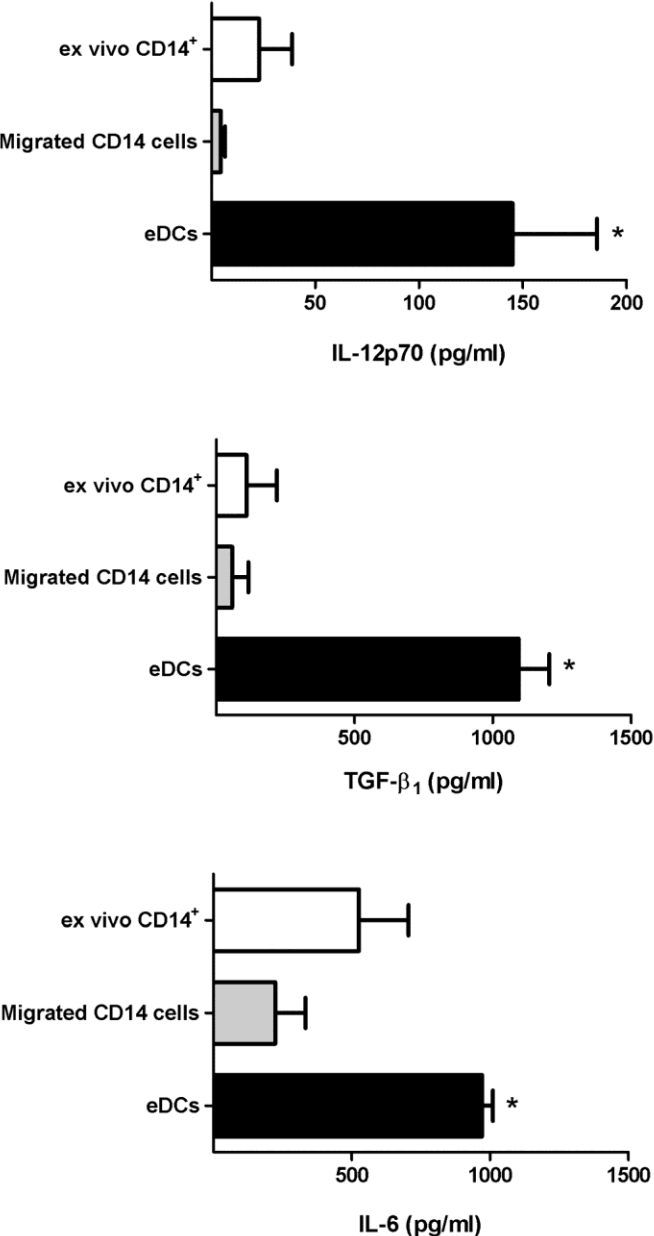


Figure 4. CD83⁺ eDCs sustain allogeneic CD4⁺ lymphocyte proliferation.

(A) CD4⁺ lymphocytes were added at different ratios (5:1 and 10:1) to allogeneic CD83⁺ purified eDCs or migrated monocytes or to CD14⁺ monocytes in the presence of PHA (positive proliferation control). Co-cultures were kept for 5 days and ³H-thymidine was added for the last 18 h of incubation. Proliferation induced by CD83⁺ eDCs was comparable to positive controls using freshly isolated CD14⁺ monocytes in the presence of PHA. Stimulation indexes using CD83⁺ eDCs were consistently greater than 30 (mean 42.0 ± 2.7, data not shown, see results section). Results are expressed as mean (cpm) ± SEM of culture triplicates from 5 independent experiments. (B) CFSE-labeled CD4⁺ T lymphocytes were added at a ratio of 5:1 to either allogeneic CD83⁺ purified eDCs or migrated monocytes and cultured for 5 days. Cells were then stained for CD4 and analyzed by flow cytometry. Flow cytometric analyses of CD4⁺ T lymphocytes show proliferation in the presence of CD83⁺ eDCs. Similar data were obtained at a ratio of 10:1 (not shown). Data shown are representative of 4 independent experiments performed in triplicate.

Figure 4

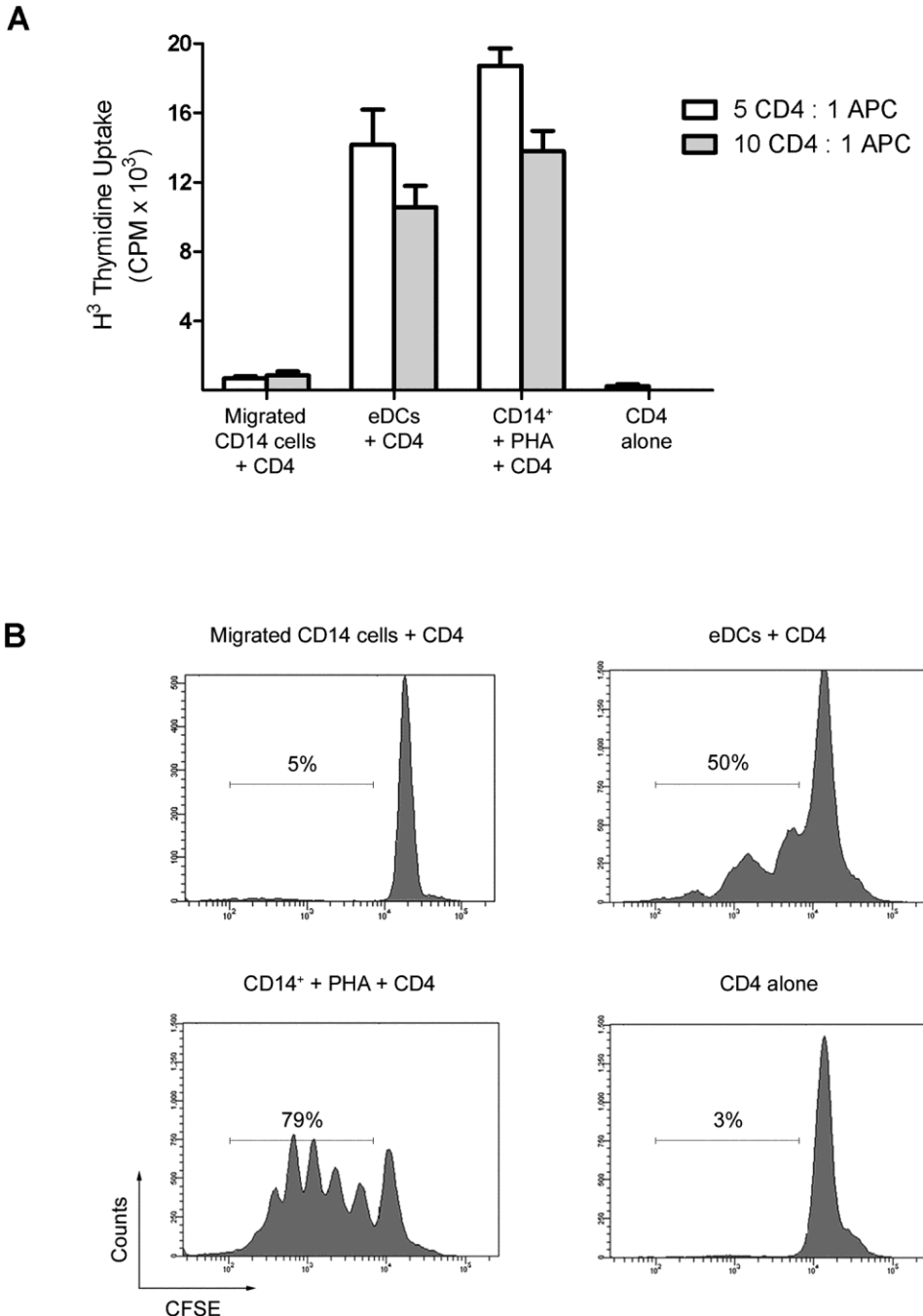


Figure 5. CD83⁺ eDCs induce the polarization of CD4⁺ lymphocytes into Th1 or Th17.

(A) CD4⁺ T lymphocytes co-cultured with either allogeneic CD83⁺ purified eDCs or migrated monocytes for 5 days were assessed for their intracellular production of IFN- γ and IL-17. CD4⁺ T lymphocytes grown in the presence of CD83⁺ eDCs and gated on CD45RO were immunopositive for either IL-17 (27.1%) or IFN- γ (7.0%). 2.7% of the cells carried both IL-17 and IFN- γ . Data shown are representative of five independent experiments using 5 different CD4⁺ cell donors and 5 eDC preparations. (B) Supernatants from co-cultures of CD4⁺ lymphocytes and CD83⁺ eDCs, migrated monocytes and PHA-treated CD14⁺ monocytes were collected and tested by ELISA for IFN- γ , IL-10 and IL-17. While PHA-treated *ex vivo* monocytes induced IFN- γ and IL-10 production, CD83⁺ eDCs promoted IFN- γ and IL-17 secretion by CD4⁺ lymphocytes. Data represent the mean \pm SEM from five independent experiments (*, $P < 0.01$).

Figure 5

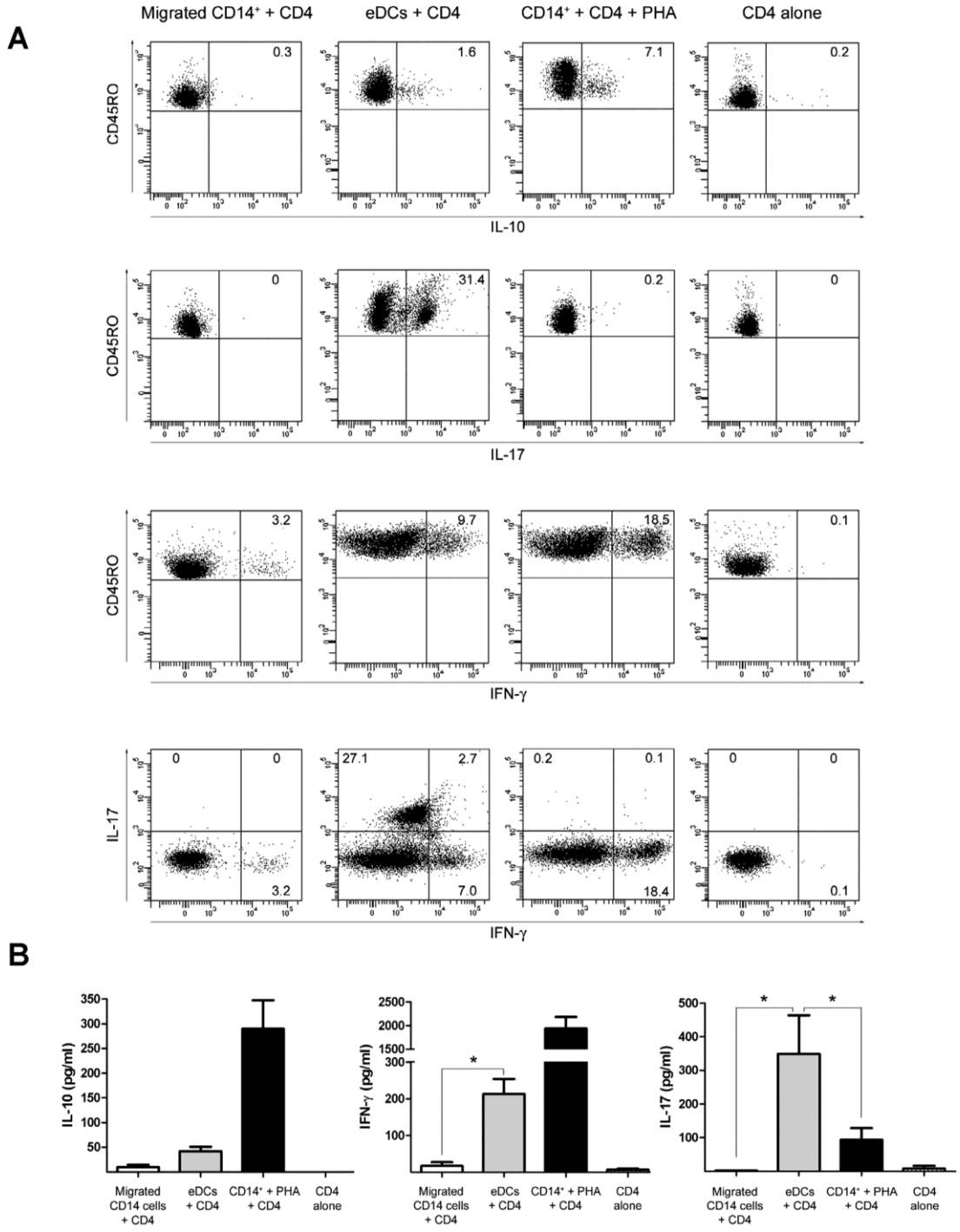


Figure 6. CD83⁺ and CD209⁺ immunopositive cells are closely associated with microvessels in active multiple sclerosis plaques.

Paraffin-embedded sections obtained from active and demyelinated multiple sclerosis (MS) lesions were immunostained for CD83 (green, upper left panel), and CD209 (green, upper right panel). Immunopositive cells for these two markers were found in perivascular infiltrates, in areas of demyelination. Nuclei (Hoechst) appear in blue, and demonstrate the intense immune cell infiltration. Isotype controls are shown in the lower 2 panels. CD83, or CD209 immunopositive cells could not be detected in normal-appearing white matter from the same tissue samples (data not shown). Photomicrographs shown are representative of immunostaining performed on 14 active plaques (25 vessels) obtained from 4 MS patients (autopsy cases). Magnification 400 x. Insert, digital zoom.

Figure 6

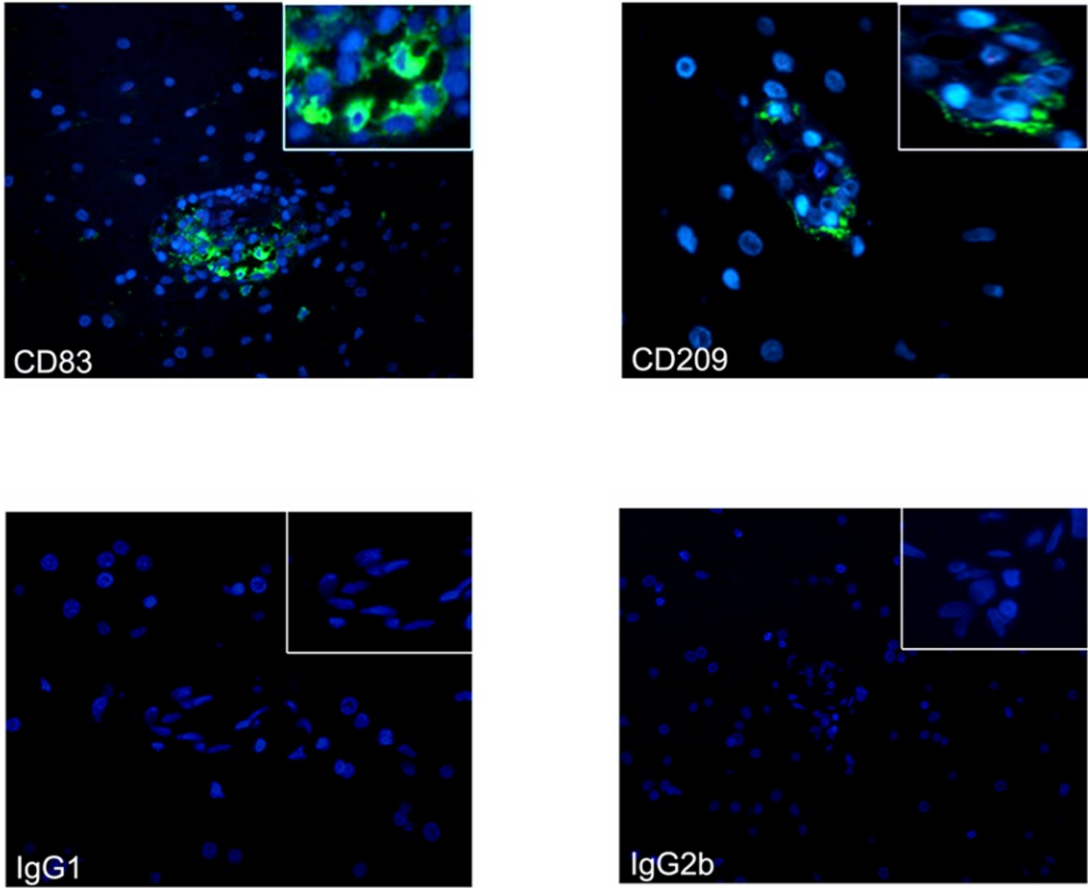
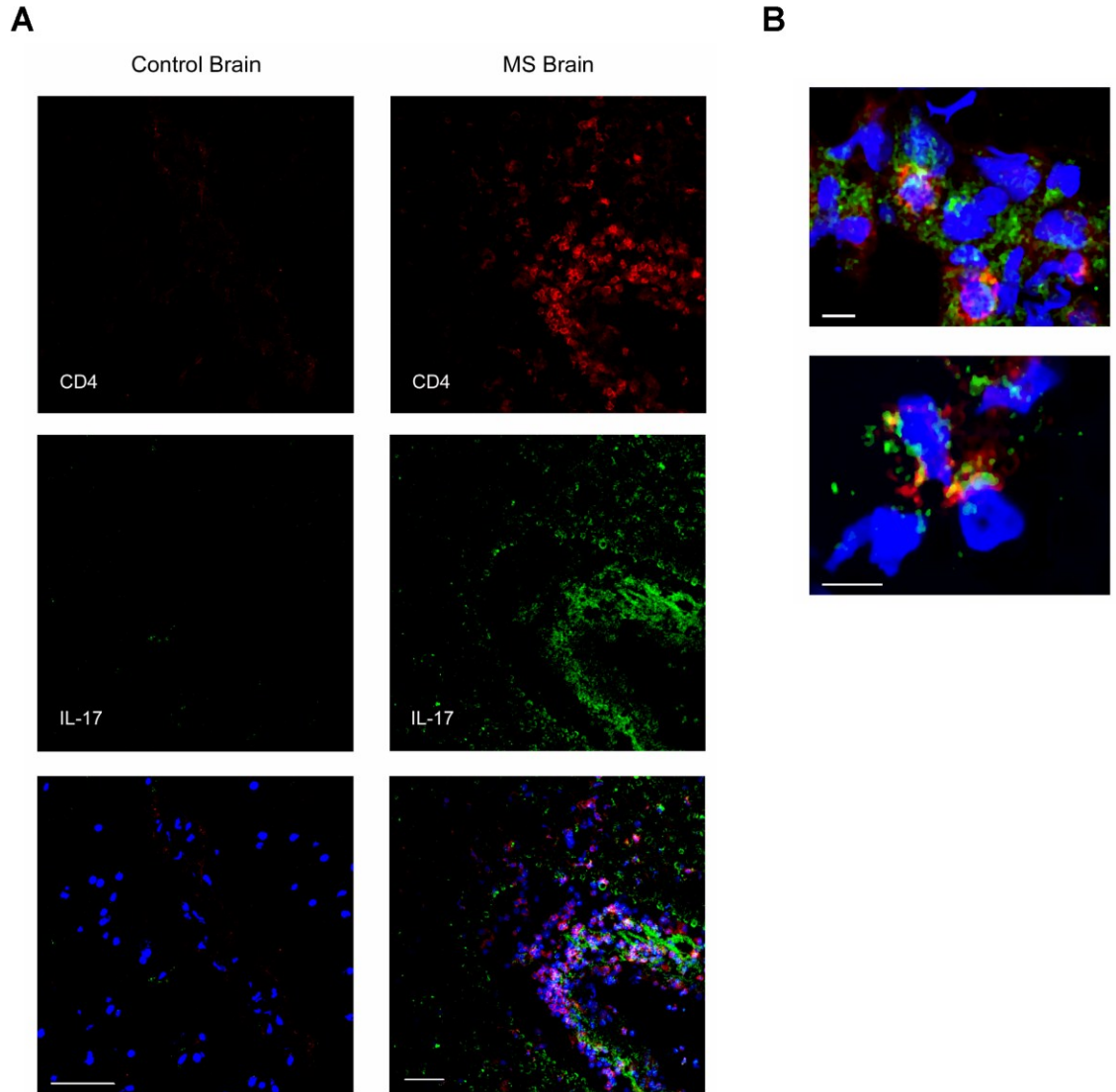


Figure 7. Infiltrating CD4⁺ cells express IL-17 in multiple sclerosis lesions.

Frozen brain tissues (10 µm sections) from control (traumatic death) and multiple sclerosis (MS) patients were immunostained for CD4 and IL-17 and acquired using Leica SP5 confocal microscope as single x-y images. (A) While no CD4 lymphocytes could be detected in CNS material obtained from non-MS controls (left panels), numerous CD4⁺ lymphocytes (red) expressing IL-17 (green) were seen in active MS lesions (right panels) ($n= 18$ lesions from 4 MS samples). White bars represent 50 µm. (B) High power magnification of CD4⁺ lymphocytes (red) and IL-17 (green) immunoreactivity seen in active MS lesions. White bars represent 10 µm.

Figure 7



Article 3: Role of Ninjurin-1 in the Migration of Myeloid Cells to CNS Inflammatory Lesions

Igal Ifergan*, Hania Kebir*, Simone Terouz, Jorge I. Alvarez, Marc-André Lécuyer, Lyne Bourbonnière, Ildiko R. Dunay, Alain Bouthillier, Robert Moumdjian, Adriano Fontana, Arsalan Haqqani, Armelle Klopstein, Marco Prinz, Rubèn López-Vales, Thomas Birchler, and Alexandre Prat

*Igal Ifergan and Hania Kebir contributed equally to the work.

Accepté pour publication dans: *Annals of Neurology*, 2011 Nov; 70 (5) : 751-763

Contributions

La protéomique sur les canaux lipidiques des cellules endothéliales du cerveau a été effectuée par Arsalan Haqqani. Les expériences d'EAE ont été effectuées en grande partie par Hania Kebir et moi-même. Les PCR relatif aux expériences d'EAE ont été effectués par Adriano Fontana et Thomas Birchler. L'évaluation de l'expression des APCs inflammatoires a été effectuée par Ildiko Dunay et Marco Prinz. Les Western bot ont été effectués par Hania Kebir et Simone Terouz. Les immunostainings ont été effectués par Hania Kebir, Simone Terouz et Jorge Alvarez. Les expériences de migration ont été réalisées par Hania Kebir, Simone Terouz et moi-même. Les expériences avec le « flow system » ont été effectuées par Marc-André Lecuyer. Les expériences de cytométrie de flux ainsi que de proliférations ont été réalisées par moi-même. Les cellules endothéliales ont été préparées par Hania Kebir, Jorge Alvarez, Marc-André Lecuyer et moi-même. Les Drs. Alain Bouthillier et Robert Moumdjian nous approvisionnaient en biopsies de cerveaux humains. Dr. Rubèn López-Vales ainsi que Armelle Klopstein nous ont donné de façon régulière leur avis scientifique sur le projet. Le manuscrit a été écrit par Dr. Alexandre Prat, Hania Kebir et moi-même.

Role of Ninjurin-1 in the Migration of Myeloid Cells to CNS Inflammatory Lesions

**Igal Ifergan*¹, Hania Kebir*¹, Simone Terouz¹, Jorge I. Alvarez¹,
Marc-André Lécuyer¹, Steve Gendron¹, Lyne Bourbonnière¹, Ildiko R. Dunay², Alain
Bouthillier³, Robert Moumdjian³, Adriano Fontana⁴, Arsalan Haqqani⁵, Armelle
Klopstein⁶, Marco Prinz², Rubèn López-Vales⁶, Thomas Birchler⁴,
and Alexandre Prat^{1,7}**

*Note: Igal Ifergan and Hania Kebir contributed equally to the work.

¹Neuroimmunology Research Unit, Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CHUM)-Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada.

²Department of Neuropathology, University of Freiburg, Freiburg, D-79106, Germany.

³Department of Neurosurgery, CHUM-Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada.

⁴Division of Clinical Immunology, University Hospital Zurich, CH-8044, Switzerland.

⁵Institute for Biological Sciences, National Research Council of Canada, Ottawa, K1A 0R6, Canada.

⁶Departament de Biologia Cel·lular, Fisiologia i Immunologia, Institut de Neurociències, CIBERNED, Universitat Autònoma de Barcelona, Bellaterra, 08193, Spain.

⁷Multiple Sclerosis Clinic, Department of Neurology, CHUM-Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada.

Corresponding author:

Alexandre Prat, MD PhD

Multiple Sclerosis Clinic and Neuroimmunology Research Unit

CHUM-Notre-Dame Hospital

1560 Sherbrooke Street East, Room Y-3608

Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada.

Phone (514) 890-8000 Ext. 24734

Running Head: Ninjurin-1 in CNS inflammation

Figures: 5 (all colors)

Supplemental Figures: 3

Table: none

Number of characters in the title and running head: 80 and 30 respectively

Abstract and Body of the manuscript word Count: 244 and 4318 respectively

Keywords: Ninjurin-1, blood-brain barrier, multiple sclerosis, experimental allergic encephalomyelitis, transmigration, diapedesis, antigen-presenting cells, monocytes, dendritic cells, macrophages.

Objective: Blood-derived myeloid antigen-presenting cells (APCs) account for a significant proportion of the leukocytes found within lesions of multiple sclerosis (MS) and of experimental allergic encephalomyelitis (EAE). These APCs along with activated microglia are thought to be pivotal in the initiation of the CNS-targeted immune response in MS and EAE. However, the exact molecules that direct the migration of myeloid cells from the periphery across the blood-brain barrier (BBB) remain largely unknown.

Methods: We identified Ninjurin-1 in a proteomic screen of human BBB-endothelial cells (ECs). We assessed the expression of Ninjurin-1 by BBB-ECs and immune cells, and we determined the role of Ninjurin-1 in immune cell migration to the CNS *in vivo* in EAE mice.

Results: Ninjurin-1 was found to be weakly expressed in the healthy human and mouse CNS but upregulated on BBB-ECs and on infiltrating APCs during the course of EAE and in active MS lesions. In human peripheral blood, Ninjurin-1 was predominantly expressed by monocytes whereas it was barely detectable on T and B lymphocytes. Moreover, Ninjurin-1 neutralization specifically abrogated the adhesion and migration of human monocytes across BBB-ECs, without affecting lymphocyte recruitment. Finally, Ninjurin-1 blockade reduced clinical disease activity and histopathological indices of EAE and decreased infiltration of macrophages, dendritic cells and APCs into the CNS.

Interpretation: Our study uncovers an important cell-specific role for Ninjurin-1 in the transmigration of inflammatory APCs across the BBB and further emphasizes the importance of myeloid cell recruitment during the development of neuroinflammatory lesions.

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is an immune-mediated disorder of the central nervous system (CNS) characterized by multifocal areas of leukocyte infiltration and demyelination. Typically, demyelination is centered around perivascular accumulation of memory CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, macrophages and dendritic cells (DCs) that arise from migration of peripheral blood immune cells across the CNS microvascular endothelium^{1,2}. Although myelin-specific T_Helper (T_H)1 and T_H17 lymphocytes are known to be crucial effectors of disease in experimental animal models of MS, their reactivation within the CNS requires the presence of resident antigen-presenting cells (APCs) and blood-derived APCs, namely macrophages and DCs, to further sustain lymphocyte proliferation and cytokine polarization in the CNS compartment³⁻⁵. In this respect, a large proportion of peripheral blood monocytes differentiate into perivascular myeloid DCs upon migration across blood-brain barrier endothelial cells (BBB-ECs). These cells have the ability to phagocytose myelin debris, to secrete interleukin (IL)-12, transforming growth factor (TGF)- β and IL-6, factors known to promote the expansion and polarization of T_H1 and T_H17 lymphocytes *in vitro* and *in vivo*^{3,5,6}.

Several lines of evidence based on studies on the animal model of MS, experimental allergic encephalomyelitis (EAE), highlight the importance of myeloid-derived APCs, whether recruited from the peripheral blood or CNS-resident, to induce and sustain local inflammation. *In vivo* pharmacological or chemical depletion of peripheral blood monocytes restricts demyelination as well as accumulation of effector lymphocytes into the CNS, leading to a significant reduction of EAE clinical signs in mice and rats⁷⁻⁹. Moreover, Greter *et al.*⁴ have shown that bone marrow-derived CD11c⁺ DCs present antigen to myelin-reactive T lymphocytes *in vivo* and promote CNS T cell invasiveness and inflammation. Aside from DCs and macrophages, which are thought to play a critical role in the development of CNS lesions¹⁰⁻¹², CNS-resident myeloid APCs, namely microglia, are also reported to reactivate T lymphocytes and to contribute to lesion formation in EAE and by extension in MS^{13,14}. Using bone thymidine kinase-induced microglial paralysis, Heppner *et al.*¹⁵ demonstrated that microglial repression reduced clinical and pathological

signs of disease. Whether these microglial cells resided in the CNS at the time of disease induction, or are bone marrow-derived and were recruited into the CNS early in the inflammatory phase, remains a subject of debate ¹⁶⁻¹⁹.

Transmigration of immune cells across the vascular wall requires the sequential activation and interaction of numerous molecular effectors expressed both by ECs and by immune cells, including selectins, chemokines, adhesion molecules and their integrin counter ligands. ICAM-1 ²⁰, VCAM-1 ²⁰, ALCAM ²¹, JAM-L ²², CD90 ²³, CD137 ²⁴ and VAP-1 ²⁵ have all previously been shown to influence leukocyte transmigration in a non-restrictive manner. In an attempt to determine additional and more specific molecular effectors of monocyte transmigration into the CNS, we performed a proteomic analysis of lipid raft membrane microdomains isolated from human brain ECs ²¹. Nerve injury-induced protein (Ninjurin)-1 was identified as an important candidate, based on the number of distinct peptides identified by mass spectrometry and the upregulation of expression under inflammatory conditions. Ninjurin-1, a 22 kDa membrane protein known to interact in a homophilic manner through an extracellular 12 residue binding motif located from Pro26 to Asn37 ²⁶, has been reported to contribute mainly to peripheral nervous system development and repair ²⁷. Its expression is strikingly upregulated on neurons and Schwann cells during experimental peripheral nerve injury. In rodents, functional inhibition of the Ninjurin-1–Ninjurin-1 homotypic interaction was shown to reduce post-lesional neurite outgrowth, suggesting a positive effect of Ninjurin-1 on nerve regeneration ^{26,27}. More recently, Ninjurin-1 was also reported to be upregulated in EAE lesions ²⁸, although the exact significance of this finding remains unknown. In the current study, we investigated the expression of Ninjurin-1 in the CNS and on human peripheral blood immune cells.

MATERIALS AND METHODS

Human CNS cell isolation and culture

Human BBB-ECs were isolated from non-epileptic material according to a previously published protocol^{5,21,29-35}. In brief, BBB-EC cultures derived from human CNS operative specimen express endothelial markers factor VIII, Ulex Agglutenens Europaensis-1 binding sites, antigen HT-7, ICAM-1, VCAM-1, E- and P-selectin until passages 7-8. No immunoreactivity for β -tubulin, α -myosin or glial fibrillary acidic protein (GFAP) could be detected, confirming the absence of contaminating smooth muscle cells or astrocytes. Occasional CD68 positive cells (microglia) are seen (less than 1-2% at passage 2) and their number decreased along passages, due to their strong adherence to plastic and their non-proliferative nature. Informed consent and ethical approval were obtained prior to surgery (CHUM Research Ethic Committee approval number HD04.046). For astrocyte culture, human cerebral hemispheres from fetuses of 17–23 weeks of gestation were obtained from the Human Fetal Tissue Repository (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY) following approved guidelines from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Primary human astrocytes were cultured as previously described^{36,37} in complete DMEM supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Invitrogen).

Leukocyte isolation and culture

Venous blood samples were obtained from consenting healthy donors in accordance with institutional guidelines (CHUM Research Ethic Committee approval numbers SL05.022 and SL05.023). *Ex vivo* CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ and CD19⁺ cells were isolated using MicroBeads (Miltenyi Biotec). Macrophages and DCs were generated from adherent PBMCS as described in *Supplementary Materials and Methods*.

Reagents

Peptides corresponding to the adhesion motif of Ninjurin-1, located between amino acids 26 and 37 (human sequence: PARWGWRHGPIIN; murine sequence: PPRWGLRNRPIN) were used as blocking peptides (referred to as Ninj₂₆₋₃₇). A scramble peptide was generated

(sequence: WRGNPGIRWAPH) and used both in mouse and human assays. Peptides were synthesized by Alpha Diagnostic International. *In vitro* and *in vivo* assays were also performed using a sheep anti-human Ninjurin-1 blocking Ab or the corresponding isotype control (both from R&D Systems).

Flow cytometry

Multicolor flow cytometry was performed on a BD LSR II Flow Cytometer and data were analyzed using BD FACSDiva software (BD Biosciences). Reagents and antibodies are described in *Supplementary Materials and Methods*.

Immunocytofluorescence

Immunocytofluorescence was performed on primary cultures of BBB-ECs as previously described ²¹. Cells were imaged using a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems). The detailed procedure is described in *Supplementary Materials and Methods*.

Immunohistochemistry

Immune cell infiltration and demyelination were determined on human and mouse brain specimens obtained from MS patients (autopsy) and EAE animals by Luxol Fast Blue-Hematoxylin-Eosin staining performed as previously described ²⁹. Ethic approval was granted by the CHUM Research Center Scientific Committee (BH 07.001). A detailed description of CNS sections stained is provided in *Supplementary Materials and Methods*.

Quantitative real time-polymerase chain reaction

The primers and the detailed procedure are described in *Supplementary Materials and Methods*.

***In vitro* model of the BBB**

BBB-ECs grown in primary culture were used to generate an *in vitro* model of the human

BBB, as previously published^{5,29}. The detailed procedure is described in *Supplementary Materials and Methods*.

Flow system

The procedure is outlined in *Supplementary Materials and Methods*.

EAE

EAE was induced by active immunization on female C57BL/6 mice purchased from Charles River Laboratories (Montreal, QC) and Jackson Laboratory (Bar Harbor, Maine), as previously published^{29,30}. Starting on day 3 post-immunization, mice were injected i.p. twice daily with 200 µg of scramble or mouse Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptides ($n = 8$). For experiments with Ninjurin-1 neutralizing Ab, mice were injected with 150 µg of anti-Ninjurin-1 blocking Ab or isotype control on day 4, 6, 8 and 10 post-induction ($n = 8$). Adoptive transfer EAE was performed by injection of splenocytes reactivated *in vitro* with MOG₃₅₋₅₅ peptide and samples from recipient mice were used for PCR analysis. Animals were monitored daily for signs of EAE and the scoring system was as follows: 0 = no clinical symptoms; 1 = floppy tail; 2 = ataxia; 3 = paralysis of one hind limb; 4 = paralysis of both hind limbs; 5 = moribund. Tissue processing is described in *Supplementary Materials and Methods*.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using GraphPad PRISM 4.0 (GraphPad software). Data are presented as the mean \pm the standard error of the mean (SEM). One-way analysis of variance (ANOVA) followed by Bonferroni multiple comparison post-hoc test was performed for all experiments except for the *in vitro* migration assay, which was done using two-way ANOVA. Only p values < 0.05 were considered significant. Data reported are from one representative experiment out of three independent experiments or pools from three to ten experiments.

RESULTS

Ninjurin-1 is highly expressed on activated human brain ECs

A fundamental feature of CNS inflammation is the adhesion of activated leukocytes to the vascular endothelium and their migration across the BBB. To identify novel molecular targets of leukocyte trafficking into the CNS, we carried out a proteomic screen of human BBB-associated proteins²¹. Several molecules with possible roles in cell adhesion were detected in this screen among which Ninjurin-1, a protein whose expression was documented in neurons and Schwann cells²⁷ but not on brain endothelium. Since Ninjurin-1 was reported to be upregulated in EAE lesions²⁸, it was selected for a more in-depth analysis.

We first confirmed expression of Ninjurin-1 in primary cultures of human BBB-ECs by flow cytometry (extracellular staining) and confocal microscopy. We detected Ninjurin-1 expression in 63.0% of resting BBB-ECs grown in astrocyte-conditioned media (ACM), previously shown to induce and maintain BBB restrictive properties *in vitro*³¹ (Fig 1A, left panel). Brain endothelium activation with tumor necrosis factor (TNF) and interferon (IFN)- γ , elicited a strong upregulation of Ninjurin-1 levels, with virtually all BBB-ECs expressing Ninjurin-1 on their surface following 24 h activation with these proinflammatory mediators (Fig 1A, by extracellular staining and flow cytometry). The upregulation of Ninjurin-1 expression following treatment with TNF and IFN- γ was consistently observed on the 10 different preparations of BBB-ECs studied (Fig 1A, right panel; $n = 10$ donors, $p < 0.001$; Fig 1B, right panel).

Ninjurin-1 is expressed by cells of the myeloid lineage in human peripheral blood leukocytes

We next examined expression of Ninjurin-1 on various subsets of human immune cells. A comprehensive FACS analysis of non-activated peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) from healthy donors revealed that Ninjurin-1 is present only on a small percentage of B and T lymphocytes (Fig 1C and D; $n = 10$). Because the level of expression of adhesion molecules on immune cells is dependent not only on the leukocyte subtype

itself but also on its state of activation, we examined the presence of Ninjurin-1 in human PBMCs stimulated for 6 days with soluble anti-CD3 antibody (Ab) and recombinant IL-2. Most T lymphocytes acquired an activated memory phenotype, as evidenced by an upregulation of CD25 and CD45RO markers. However, activated CD4⁺ and CD8⁺ T cells showed only a modest upregulation of Ninjurin-1 when compared to *ex vivo* cells (Fig 1D; *n* = 6).

In contrast to T lymphocytes, a significant proportion of *ex vivo* human CD14⁺ monocytes (46.7%) express Ninjurin-1 on their surface (Fig 1D and E; *n* = 13). CD14⁺ monocytes showed by far the strongest expression of Ninjurin-1 by Western blot (WB) of all isolated subpopulations (Fig 1F). To gain further information on the expression pattern of Ninjurin-1 in cells of the myeloid lineage, monocyte-derived DCs and macrophages were generated *in vitro*. Expression of Ninjurin-1 was significantly upregulated both on human CD68⁺ macrophages and on CD83⁺ myeloid DCs (Fig 1D and E; *n* = 3).

Increased expression of Ninjurin-1 on inflammatory APCs in the CNS of EAE mice

In their initial characterization study, Araki and Milbrandt reported a relatively low expression of Ninjurin-1 in the intact CNS, at least in rodents²⁷. Consistent with these observations, we found Ninjurin-1 to be weakly expressed in spinal cord homogenates of non-immunized C57BL/6 control mice (Fig 2A to C). However, we noted a marked upregulation of Ninjurin-1 mRNA and protein in adoptively transferred (Fig 2A and B) and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-immunized (Fig 2C) EAE mice, with the highest expression observed at the peak of the disease and lower levels in the pre-symptomatic phase.

When looking specifically at the cells expressing Ninjurin-1 in the spleen and in brain and spinal cord homogenates of actively-induced EAE animals, we found that Ninjurin-1 was expressed mainly by CD45^{hi} CD11b⁺ cells (Fig 2D; *n* = 3). We also observed an upregulation of CD11b⁺ Ninjurin-1⁺ cells in the CNS of EAE mice as compared to the spleen. Selective gating on CD45^{hi} CD11b⁺ infiltrating APCs revealed that CD11c⁺ DCs and F4/80⁺ macrophages invading the CNS were all important sources of Ninjurin-1, with

CD3⁺ T lymphocytes consistently expressing low levels of Ninjurin-1 (Fig 2D; $n = 3$, $p < 0.001$). Histological examination of frozen spinal cord sections obtained from EAE animals confirmed expression of Ninjurin-1 by myeloid APCs, including CD11c⁺ DCs and F4/80⁺ macrophages, with stronger expression on F4/80⁺ cells (Fig 2E).

The surface marker Ly6C has been used to discriminate two subsets of non CNS, peripheral blood-derived APCs: a population of Ly6C^{hi} CD11b⁺-expressing APCs referred to as “inflammatory APCs” and a population termed “non-inflammatory APCs” characterized by a low expression of Ly6C (Ly6C^{lo})³⁸. Accumulation of inflammatory CD11b⁺ Ly6C^{hi} APCs in the CNS of mice was reported to correlate with earlier onset and increased severity of clinical EAE³⁹. We found that most CD45^{hi} CD11b⁺ Ly6C^{hi} inflammatory APCs in the CNS of EAE mice expressed Ninjurin-1, whereas CD45^{hi} CD11b⁺ Ly6C^{lo} non-inflammatory APCs expressed lower levels of Ninjurin-1 (Fig 2F).

Ninjurin-1 is upregulated in MS lesions

Matching our observations in mice, we found Ninjurin-1 to be barely detectable in human control non-inflamed brain tissue. Likewise, expression of Ninjurin-1 was weak in normal-appearing white matter (NAWM) obtained from MS brain specimens, with occasional discrete Ninjurin-1 immunoreactive microvessels (Fig 3A, left panel, arrowheads; $n = 3$ MS patients) which co-localized with Caveolin-1 on the surface of ECs (Fig 3C). Ninjurin-1 was significantly upregulated in MS lesions (Fig 3B; $p < 0.001$) and found to be expressed predominantly by ECs (Fig 3D, left panels) and by cells with a foamy appearance scattered throughout the parenchyma (Fig 3A, right panel). Double immunostaining analyses of active MS lesions ($n = 12$ active lesions from 3 MS patients) revealed that Ninjurin-1 was expressed by infiltrating DC-SIGN⁺ DCs (Fig 3D, right panels) and even more by CD68⁺ macrophages (Fig 3D, center panels). We did not detect Ninjurin-1 on neurons or oligodendrocytes in NAWM and active MS lesions. Collectively, the *in vivo* and *in situ* data confirm an enrichment of Ninjurin-1⁺ myeloid APCs in the inflamed CNS and suggest their preferential recruitment during neuroinflammatory conditions.

Ninjurin-1 mediates the transmigration of monocytes across the brain endothelium

Given that Ninjurin-1 was shown to mediate cell–cell interactions through homotypic binding, we elected to determine whether adhesion of monocytes to the brain vascular endothelium could induce the formation of transmigratory cups enriched in Ninjurin-1, as demonstrated for other cell adhesion molecules^{20,21}. Sorted human CD14⁺ monocytes of healthy donors were loaded with CFSE and allowed to bind to primary cultures of activated human BBB-ECs. Ninjurin-1 immunostaining was visualized by confocal microscopy and revealed strong expression of the adhesion molecule in a cup-like structure surrounding CFSE-loaded monocytes (Fig 4A, arrows). 3D reconstruction images further showed clusters of Ninjurin-1 immunoreactivity within the transmigratory cup (arrowhead) as well as formation of EC projections. These data underscore the potential involvement of Ninjurin-1 in monocyte trafficking across BBB-ECs.

To address the specific contribution of Ninjurin-1 to the transmigration of immune cells across human brain ECs, CD14⁺ monocytes, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes isolated from the peripheral blood of healthy donors were allowed to adhere to and migrate across confluent monolayers of human BBB-ECs grown in modified Boyden chambers. Pre-treatment of ECs with an anti-Ninjurin-1 blocking Ab or with Ninj_{26–37} blocking peptide induced a significant reduction in the migration of peripheral blood CD14⁺ monocytes, as compared to ECs treated with isotype control or scramble peptide (Fig 4B and C; $n = 7$, $p < 0.001$). However, Ninjurin-1 neutralization did not affect the migration of CD4⁺ or CD8⁺ T lymphocytes (Supplementary Figure 1; $n = 7$). The transmigration of CD14⁺ cells was abrogated in a similar manner when, instead of neutralizing Ninjurin-1 on ECs, monocytes were pre-treated for 1 h with anti-Ninjurin-1 blocking Ab.

We next elected to study the role of Ninjurin-1 in the adhesion of CD14⁺ monocytes to BBB-ECs in a dynamic shear-stress and pressure controlled flow assay system (2000 $\mu\text{m}/\text{sec}$). We measured the velocity, which is defined as the speed of each individual immune cell in the assay, taking into consideration cells that are fully adhering, crawling, rolling or those that are not interacting with ECs at all. The velocity of CD14⁺ immune cells was measured after 5 and 20 minutes using 3 videos recorded over 30 sec for each time

point. Each point shown in Figure 4D and E represents the mean velocity of a single cell during the 30 sec recording. The number of firmly adherent (CD14⁺ cells immobilized on BBB-ECs) was counted on 15 pictures taken during the period between 0–5 min and 30–60 min. The velocity of CD14⁺ cells was significantly increased at early (5 min) and late (20 min) time-points when ECs were treated with anti-Ninjurin-1 blocking Ab or Ninj_{26–37} blocking peptide as compared to their corresponding controls and to PBS (Fig 4D and E; $n = 4$, $p < 0.001$). The overall velocity of all events recorded was reduced after 20 min as compared to 5 min because the number of rolling, crawling and adherent monocytes had increased between these 2 time points. Accordingly, the number of CD14⁺ cells which adhered to ECs was higher in controls and PBS than in Ninjurin-1 blocking groups (Fig 4F and G; $n = 4$, $p < 0.001$). Collectively, these data provide evidence that Ninjurin-1 neutralization strategies decrease monocyte adhesion to BBB-ECs, therefore increasing monocyte velocity in the flow assay, and demonstrate the important role of Ninjurin-1 for monocyte migration across BBB-ECs.

Ninjurin-1 blockade does not impact on antigen presentation

We next assessed whether pharmacological blockade of Ninjurin-1 could influence the capacity of human CD14⁺ monocytes to promote the proliferation and polarization of CD4⁺ T_H lymphocytes. We found the addition of anti-Ninjurin-1 blocking Ab did not alter the proliferation of T_H cells (Supplementary Figure 2A and B; $n = 3$), nor the expression of CD25 and the cytokine production. Similar results were obtained in mice (Supplementary Figure 2C and D; $n = 3$)

Functional role of Ninjurin-1 during CNS inflammation

The recruitment of myeloid APCs into the CNS is considered an important early event in the development of CNS inflammation. To establish the contribution of Ninjurin-1 to the development of CNS inflammatory lesions, we performed pharmacological blockade of Ninjurin-1 in MOG_{35–55}-induced EAE animals. Anti-Ninjurin-1 blocking Ab or isotype control (150 µg per time-point) were injected intraperitoneally (*i.p.*) to mice at day 4, 6, 8

and 10 post-immunization. Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide or scramble (200 µg, *i.p.*, twice a day) were injected from day 3 until day 23 post-immunization. Blockade of Ninjurin-1 either with the Ab or the peptide resulted in a sustained and significant reduction in disease clinical score, as compared to animals receiving the isotype control or scramble peptide, respectively (Fig 5A and Supplementary Figure 3A; $n = 8$ mice per group, $p < 0.01$ and $p < 0.05$ respectively).

We next sought to determine whether Ninjurin-1 blockade was associated with reduced demyelination and immune cell infiltration, two hallmarks of EAE pathology. Luxol fast blue-hematoxylin and eosin staining of the spinal cord from Ninjurin-1-treated EAE mice revealed a reduction in immune cell infiltration and demyelination (Fig 5B and Supplementary Figure 3B). In particular, numbers of CD45^{hi} CD11b⁺ infiltrating APCs, CD45^{hi} CD11b⁺ CD11c⁺ DCs and CD45^{hi} CD11b⁺ F4/80⁺ macrophages (Fig 5C; $n = 3$ mice analyzed per group, $p < 0.001$ for CD11b⁺ cells, $p < 0.05$ for CD11c⁺ cells and $p < 0.01$ for F4/80⁺ cells), as well as CD45^{hi} CD11b⁺ Ly6C⁺ inflammatory APCs (Fig 5D; $n = 3$) were markedly reduced in animals treated with Ninjurin-1 blocking Ab, as compared to control mice. The effect of Ninjurin-1 blockade on the recruitment of APCs correlated with a reduction in the number of CD4⁺ T lymphocytes found in the CNS (Fig 5C), presumably as a consequence of the requirement for APCs in lymphocyte reactivation and expansion within the CNS. Interestingly, infiltration of CD8⁺ T lymphocytes was not reduced in anti-Ninjurin-1-treated animals (Fig 5C). The reduction of infiltrating APCs in spinal cord of EAE mice treated with anti-Ninjurin-1 Ab was confirmed by *in situ* immunostaining (Fig 5E and Supplementary Figure 3C; $n = 3$ mice analyzed per group, $p < 0.001$ for CD11c⁺ and F4/80⁺ cells in Ab-treated mice; $p < 0.05$ for CD11c⁺ cells and $p < 0.001$ for F4/80⁺ cells in peptide-treated mice). Collectively, these data demonstrate that Ninjurin-1 is important for DC, macrophage and inflammatory APC recruitment to the CNS and that Ninjurin-1 blockade alleviates clinical and pathological determinants of autoimmune CNS-targeted inflammation.

DISCUSSION

Ninjurin-1 was originally described as a molecule involved in neuron-glia interactions, promoting axonal sprouting and nerve repair. Recently, Ahn *et al.* showed that Ninjurin-1 was expressed at low levels in normal adult rat brain, but its expression was increased in EAE, particularly on macrophages/monocytes, neutrophils and ECs. In addition, they reported an enhanced adhesion between BV2 cells (murine monocyte lineage microglia) and ECs, when both cell types were transfected with a mouse Ninjurin-1 expression vector²⁸. The current study expands the concept of Araki *et al.* and Ahn *et al.* and demonstrates the important role of Ninjurin-1 as an adhesion molecule whose binding through the Ninj₂₆₋₃₇ motif mediates the specific interaction between peripheral blood myeloid cells and BBB-ECs. We demonstrate herein, using human biological samples and mouse EAE that BBB-ECs, peripheral blood monocytes, macrophages and DCs express Ninjurin-1 and that its expression is regulated *in vitro* by pro-inflammatory signals and *in vivo* during neuroinflammatory conditions. Although analysis of *in situ* immunostainings of MS and EAE CNS material seems to show stronger Ninjurin-1 staining on macrophages compared to DCs, we did not detect a significant difference in Ninjurin-1 expression on these two cell types by flow cytometry analysis, when looking at both human and mouse macrophages and DCs, *in vitro*, *in situ* or *ex vivo*. Finally, functional blockade of Ninjurin-1 with either a blocking Ab or with a blocking peptide significantly reduces myeloid cell attachment and migration across BBB-ECs, as well as clinical signs of EAE, confirming that Ninjurin-1-expressing myeloid cells are important cellular mediators of lesion formation in EAE. Collectively, our results emphasize the important role played by Ninjurin-1 in the development of CNS lesions by its ability to specifically regulate the migration of APCs, without affecting lymphocyte trafficking.

Interfering with leukocyte extravasation and diapedesis by blocking the adhesion cascade has proven to be beneficial in reducing clinical disease activity and pathological indices in MS⁴⁰, psoriasis⁴¹ and inflammatory bowel diseases⁴². Natalizumab and Efalizumab, which block VLA-4 and LFA-1 respectively, are reported to reduce migration of most leukocyte subtypes into the target organs. While mechanistically appealing, this

broad-targeted inhibitory approach leaves little room for the immune system to maintain anti-viral, anti-bacterial and anti-tumoral surveillance functions since most immune cell subtypes including T_H1 , T_H2 , T_H17 lymphocytes, monocytes, myeloid DCs, granulocytes and neutrophils express high levels of VLA-4 and LFA-1^{29,43}. Despite the highly beneficial therapeutic efficacy of VLA-4 and LFA-1, pharmaco-vigilance data suggest that the magnitude of adverse events occurring in patients treated with these adhesion molecule inhibitors has previously been underestimated both in frequency and in intensity. Reported complications include the emergence of life-threatening viral CNS infections (progressive multifocal leukoencephalopathy⁴⁴) as well as the rapid progression of malignant melanomas⁴⁵. One of the most appealing benefits of blocking Ninjurin-1 (rather than VLA-4 or LFA-1) resides in its cell specificity and in the fact that Ninjurin-1 is weakly expressed in non-inflamed BBB-ECs. This suggests that the crucial baseline immuno-surveillance of the brain would not be altered during Ninjurin-1 blockade.

While Ninjurin-1 was found to be up-regulated in an experimental peripheral nerve injury model²⁷, especially in neurons and Schwann cells, and to contribute to Schwann cell-mediated neurite outgrowth and repair, we did not find evidence for Ninjurin-1 expression on neurons or on oligodendrocytes in the normal or inflamed CNS in human and mouse samples. This could indicate that while Ninjurin-1 is involved in repair of peripheral nerves following traumatic injury, it does not seem to contribute to this process within the CNS, especially when injury is autoimmune in nature.

There is evidence in EAE that blockade of adhesion molecules or their receptors on BBB-ECs and immune cells decreases the influx of leukocytes into the CNS and alleviates clinical symptoms⁴⁶⁻⁴⁸. We now provide evidence that blockade of Ninjurin-1 reduces specifically myeloid cell influx into the CNS and alleviates disease severity in EAE, without impacting on disease incidence and time of onset. Furthermore, we also show that Ninjurin-1 blockade reduces the number of $CD4^+$ T lymphocytes but not $CD8^+$ T lymphocytes in the CNS, even though Ninjurin-1 is almost exclusively expressed on $CD11b^+$ APCs. These data suggest that peripheral T cell priming and activation during initiation of the disease is triggered properly, but cannot be sustained within the target

organ, probably as consequence of the defective entry of Ninjurin-1⁺ inflammatory APCs into the CNS compartment. This hypothesis is further supported by data showing that Ninjurin-1 blocking Ab and peptide do not impact on T lymphocyte migration, proliferation or cytokine response.

In conclusion, our data support the importance of myeloid cell recruitment in lesion formation in experimental organ-targeted CNS inflammation and provide a novel therapeutic approach to specifically restrict monocyte, macrophage and DC migration to the CNS. Whether Ninjurin-1 is also involved in the recruitment of specific immune cell populations in non-CNS organs and partakes in the development of additional autoimmune diseases, such as psoriasis, inflammatory bowel diseases or arthritis remains to be established. Overall, a better understanding of the mechanism by which leukocytes transmigrate across ECs and a well-defined characterization of the adhesion molecules involved in the recruitment of specific subsets of immune cells into the target tissue could provide means to reduce organ-targeted inflammation, without affecting immune surveillance.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the important contribution of patients who have donated blood and autopsy material. We also would like to thank Dr. J. P. Antel, Dr. C. Lambert and Dr. J. van Horsen. This study was supported by operating grants from the MS Society of Canada (MSSC) and the CIHR (MOP 89885 and MOP 14828) to AP.

REFERENCES

1. Lassmann H. Multiple sclerosis pathology: evolution of pathogenetic concepts. *Brain Pathol.* 2005; 15:217-222.
2. Henderson AP, Barnett MH, Parratt JD, et al. Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol.* 2009; 66:739-753.
3. Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, et al. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4⁺ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat Immunol.* 2007; 8:172-180.
4. Greter M, Heppner FL, Lemos MP, et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2005; 11:328-334.
5. Ifergan I, Kebir H, Bernard M, et al. The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain.* 2008; 131:785-799.
6. McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, et al. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med.* 2005; 11:335-339.
7. Tran EH, Hoekstra K, van Rooijen N, et al. Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *J Immunol.* 1998; 161:3767-3775.
8. Huitinga I, Van RN, De Groot CJ, et al. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med.* 1990; 172:1025-1033.
9. Jung S, Huitinga I, Schmidt B, et al. Selective elimination of macrophages by dichlormethylene diphosphonate-containing liposomes suppresses experimental autoimmune neuritis. *J Neurol Sci.* 1993; 119:195-202.

10. Isaksson M, Ardesjo B, Ronnblom L, et al. Plasmacytoid DC promote priming of autoimmune Th17 cells and EAE. *Eur J Immunol.* 2009; 39:2925-2935.
11. Schreiner B, Bailey SL, Shin T, et al. PD-1 ligands expressed on myeloid-derived APC in the CNS regulate T-cell responses in EAE. *Eur J Immunol.* 2008; 38:2706-2717.
12. Dijkstra S, Kooij G, Verbeek R, et al. Targeting the tetraspanin CD81 blocks monocyte transmigration and ameliorates EAE. *Neurobiol Dis.* 2008; 31:413-421.
13. Jack C, Ruffini F, Bar-Or A, et al. Microglia and multiple sclerosis. *J Neurosci Res.* 2005; 81:363-373.
14. Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, et al. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res.* 2005; 81:374-389.
15. Heppner FL, Greter M, Marino D, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nat Med.* 2005; 11:146-152.
16. Simard AR, Rivest S. Bone marrow stem cells have the ability to populate the entire central nervous system into fully differentiated parenchymal microglia. *FASEB J.* 2004; 18:998-1000.
17. Hess DC, Abe T, Hill WD, et al. Hematopoietic origin of microglial and perivascular cells in brain. *Exp Neurol.* 2004; 186:134-144.
18. Malm TM, Koistinaho M, Parepalo M, et al. Bone-marrow-derived cells contribute to the recruitment of microglial cells in response to beta-amyloid deposition in APP/PS1 double transgenic Alzheimer mice. *Neurobiol Dis.* 2005; 18:134-142.
19. Ajami B, Bennett JL, Krieger C, et al. Local self-renewal can sustain CNS microglia maintenance and function throughout adult life. *Nat Neurosci.* 2007; 10:1538-1543.

20. Carman CV, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol.* 2004; 167:377-388.
21. Cayrol R, Wosik K, Berard JL, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol.* 2008; 9:137-145.
22. Luissint AC, Lutz PG, Calderwood DA, et al. JAM-L-mediated leukocyte adhesion to endothelial cells is regulated in cis by alpha4beta1 integrin activation. *J Cell Biol.* 2008; 183:1159-1173.
23. Wetzel A, Chavakis T, Preissner KT, et al. Human Thy-1 (CD90) on activated endothelial cells is a counterreceptor for the leukocyte integrin Mac-1 (CD11b/CD18). *J Immunol.* 2004; 172:3850-3859.
24. Drenkard D, Becke FM, Langstein J, et al. CD137 is expressed on blood vessel walls at sites of inflammation and enhances monocyte migratory activity. *FASEB J.* 2007; 21:456-463.
25. Salmi M, Tohka S, and Jalkanen S. Human vascular adhesion protein-1 (VAP-1) plays a critical role in lymphocyte-endothelial cell adhesion cascade under shear. *Circ Res.* 2000; 86:1245-1251.
26. Araki T, Zimonjic DB, Popescu NC, et al. Mechanism of homophilic binding mediated by ninjurin, a novel widely expressed adhesion molecule. *J Biol Chem.* 1997; 272:21373-21380.
27. Araki T, Milbrandt J. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron.* 1996; 17:353-361.
28. Ahn BJ, Lee HJ, Shin MW, et al. Ninjurin1 is expressed in myeloid cells and mediates endothelium adhesion in the brains of EAE rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 387:321-325.

29. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing T H 17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2009; 66:390-402.
30. Kebir H, kreymborg K, Ifergan I, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 2007; 13:1173-1175.
31. Prat A, Biernacki K, Wosik K, et al. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia.* 2001; 36:145-155.
32. Cayrol R, Haqqani AS, Ifergan I, et al. Isolation of human brain endothelial cells and characterization of lipid raft-associated proteins by mass spectroscopy. *Methods Mol Biol.* 2011; 686:275-295.
33. Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, et al. Angiotensin II Controls Occludin Function and Is Required for Blood Brain Barrier Maintenance: Relevance to Multiple Sclerosis. *J Neurosci.* 2007; 27:9032-9042.
34. Ifergan I, Wosik K, Cayrol R, et al. Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 2006; 60:45-55.
35. Prat A, Biernacki K, Becher B, et al. B7 expression and antigen presentation by human brain endothelial cells: requirement for proinflammatory cytokines. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000; 59:129-136.
36. Jack CS, Arbour N, Manusow J, et al. TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol.* 2005; 175:4320-4330.
37. Lambert C, Desbarats J, Arbour N, et al. Dendritic cell differentiation signals induce anti-inflammatory properties in human adult microglia. *J Immunol.* 2008; 181:8288-8297.
38. Geissmann F, Jung S, and Littman DR. Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity.* 2003; 19:71-82.

39. King IL, Dickendesh TL, and Segal BM. Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood*. 2009; 113:3190-3197.
40. Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2003; 348:15-23.
41. Lebwohl M, Tying SK, Hamilton TK, et al. A novel targeted T-cell modulator, efalizumab, for plaque psoriasis. *N Engl J Med*. 2003; 349:2004-2013.
42. Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, et al. Natalizumab for active Crohn's disease. *N Engl J Med*. 2003; 348:24-32.
43. Archelos, JJ and Hartung, HP. Adhesion molecules in multiple sclerosis: a review. In: Siva A, ed. *Frontiers in Multiple Sclerosis vol2*. London: Martin Dunitz, 1999:85-116.
44. Langer-Gould A, Atlas SW, Green AJ, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *N Engl J Med*. 2005; 353:375-381.
45. Mullen JT, Vartanian TK, and Atkins MB. Melanoma complicating treatment with natalizumab for multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008; 358:647-648.
46. Bullard DC, Hu X, Schoeb TR, et al. Intercellular adhesion molecule-1 expression is required on multiple cell types for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2007; 178:851-857.
47. Cannella B, Cross AH, and Raine CS. Anti-adhesion molecule therapy in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1993; 46:43-55.
48. Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, et al. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 1992; 356:63-66.

FIGURE LEGENDS

Figure 1. Ninjurin-1 is upregulated in primary cultures of human BBB-ECs during inflammation and is specifically expressed on human myeloid APCs

(A) FACS analysis of Ninjurin-1 expression in resting human primary BBB-ECs (left panel, control, blue histogram) and in BBB-ECs treated with TNF+IFN- γ (100 U/ml, 24 h) (red histogram). Isotype control is depicted by the black line histogram. Ninjurin-1 expression was assessed on 10 different preparations of BBB-ECs and shows a consistent upregulation on the surface of BBB-ECs following treatment with TNF and IFN- γ ($n = 10$; ***, $p < 0.001$). (B) Confocal microscopy confirms expression of Ninjurin-1 (green) on the surface of human resting BBB-ECs (control) and upregulation following treatment with TNF and IFN- γ . TO-PRO-3 was used for nuclear staining (blue) (Scale bar: 10 μm , $n = 3$). (C) FACS analyses of Ninjurin-1 expression on *ex vivo* human CD19⁺, CD4⁺ or CD8⁺ lymphocytes demonstrate low levels on B and T lymphocytes. Isotype controls are represented by black histograms and Ninjurin-1 immunostaining is shown in red. (D) Compilation of Ninjurin-1 expression by flow cytometry on CD19⁺ ($n = 10$), CD4⁺ ($n = 14$), CD8⁺ ($n = 11$) lymphocytes, anti-CD3 + IL-2 activated CD4⁺ ($n = 7$), anti-CD3 + IL-2 activated CD8⁺ ($n = 6$) lymphocytes, CD14⁺ monocytes ($n = 13$), *in vitro* generated CD68⁺ macrophages ($n = 3$) and *in vitro* generated CD83⁺ DCs ($n = 3$) (***, $p < 0.001$). (E) FACS analyses of Ninjurin-1 expression on human *ex vivo* CD14⁺ monocytes, on *in vitro* generated CD68⁺ macrophages and on CD83⁺ DCs demonstrate high expression of Ninjurin-1 on myeloid APCs. (F) WB analysis of the expression of Ninjurin-1 in *ex vivo* human CD8⁺, CD4⁺, CD14⁺ and CD19⁺ leukocytes. β -actin was used as loading control. Data shown are representative of five independent experiments.

Figure 1

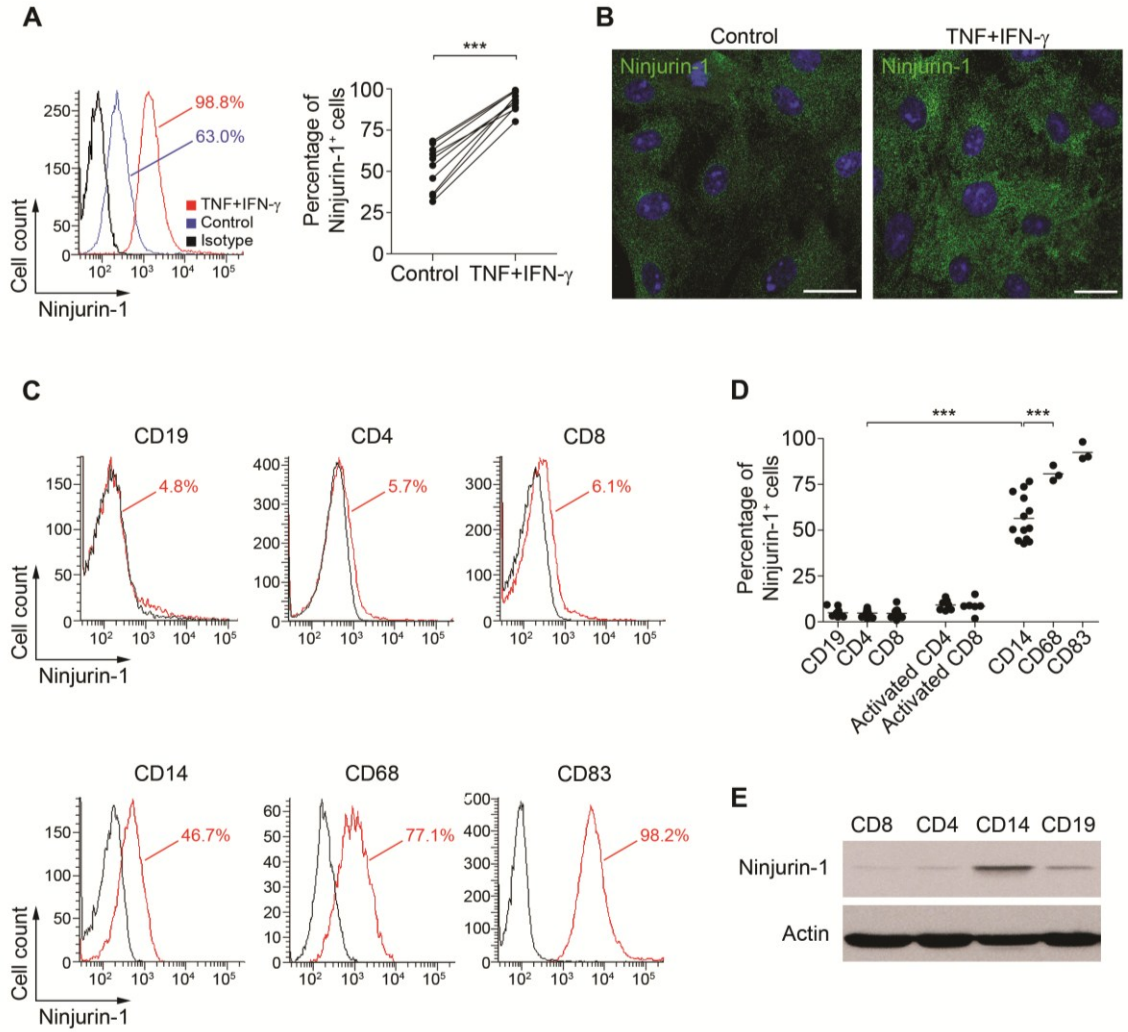


Figure 2. Ninjurin-1 is upregulated in the CNS of EAE mice at the peak of disease

(A) Relative mRNA and (B) protein expression of Ninjurin-1 in the spinal cord of C57BL/6 EAE mice following adoptive transfer of MOG_{35–55}-reactive splenocytes. Spinal cord samples were analyzed at different time points during the course of the disease. PS: pre-symptomatic. β -Tubulin was used as a loading control for WB. Error bars represent the SEM. (C) WB for Ninjurin-1 in spinal cord homogenates of MOG_{35–55}-immunized C57BL/6 mice with scores ≤ 1.0 (PS) and ≥ 2.5 (Peak). Naïve un-immunized mice were used as controls. β -actin served as a loading control. Data shown in panels A–C are representative of four independent experiments. (D) FACS analysis showing expression of Ninjurin-1 and CD11b on CD45^{hi} cells of the spleen (left panel) and the CNS (right panel) of MOG_{35–55}-immunized mice at the peak of the disease. Most Ninjurin-1⁺ cells are CD11b⁺. Detailed analysis performed by gating on various subsets of CD45^{hi} cells demonstrates high levels of Ninjurin-1 expression on CNS-infiltrating CD11b⁺ cells, CD11b⁺ CD11c⁺ DCs, and CD11b⁺ F4/80⁺ macrophages ($n = 3$), as compared to those found in the spleen ($n = 4$). CD3⁺ lymphocytes consistently express low levels of Ninjurin-1 (***, $p < 0.001$). (E) Spinal cord sections from EAE mice immunostained for Ninjurin-1 (green) and CD11c (red, upper panel) or F4/80 (red, lower panel) and TO-PRO-3 (blue) at the peak of the disease ($n = 6$). High power magnifications confirm co-localization of Ninjurin-1 immunostaining with markers of myeloid APCs. Scale bars, 30 μ m. (F) Ly6C expression on CD45^{hi} CD11b⁺ cells collected from the spinal cord of MOG_{35–55}-immunized mice. Expression of Ninjurin-1 was evaluated on CD45^{hi} CD11b⁺ Ly6C^{hi} (red, inflammatory APCs,) and on CD45^{hi} CD11b⁺ Ly6C^{lo} (blue, non-inflammatory APCs) and showed that most inflammatory APCs express Ninjurin-1. Data shown are representative of two independent experiments.

Figure 2

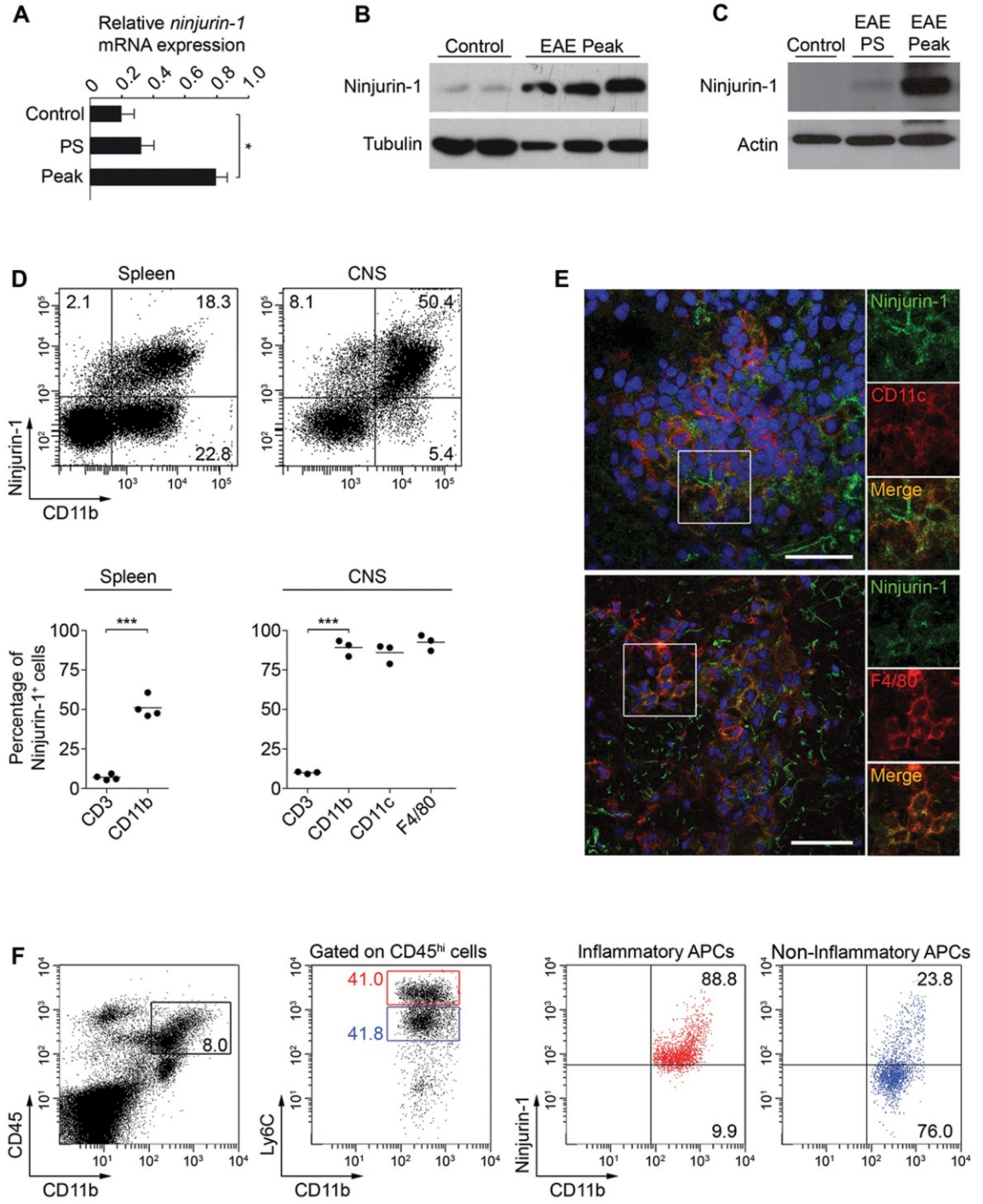


Figure 3. Ninjurin-1 expression is upregulated in MS

(A) Immunohistochemical staining for Ninjurin-1 in NAWM blood vessels of human CNS post-mortem sections (left panel). Arrowheads show Ninjurin-1-expressing ECs. Ninjurin-1 expression is detectable on ECs and on infiltrating immune cells in MS lesions (right panel). DAB with hematoxylin counterstain. Scale bars, 50 μm . (B) Quantification of Ninjurin-1 immunoreactivity on immune cells and ECs (pixel intensity) in 15 distinct active MS lesions compared to NAWM (***, $p < 0.001$). (C) Co-expression of Ninjurin-1 (green) and Caveolin-1 (red) on ECs within NAWM from MS patients. Scale bar, 30 μm . (D) Immunofluorescent staining and confocal microscopy analysis of active MS lesions expressing Ninjurin-1 (green) and either Caveolin-1 (red), CD68⁺ (red) or DC-SIGN⁺ (red). Co-localization is shown in lower panels, along with TO-PRO-3 (blue). Scale bars, 30 μm . Photomicrographs shown in (C) and (D) are representative of immunostainings performed on 12 active plaques and 15 NAWM areas obtained from CNS material of $n = 3$ MS patients.

Figure 3

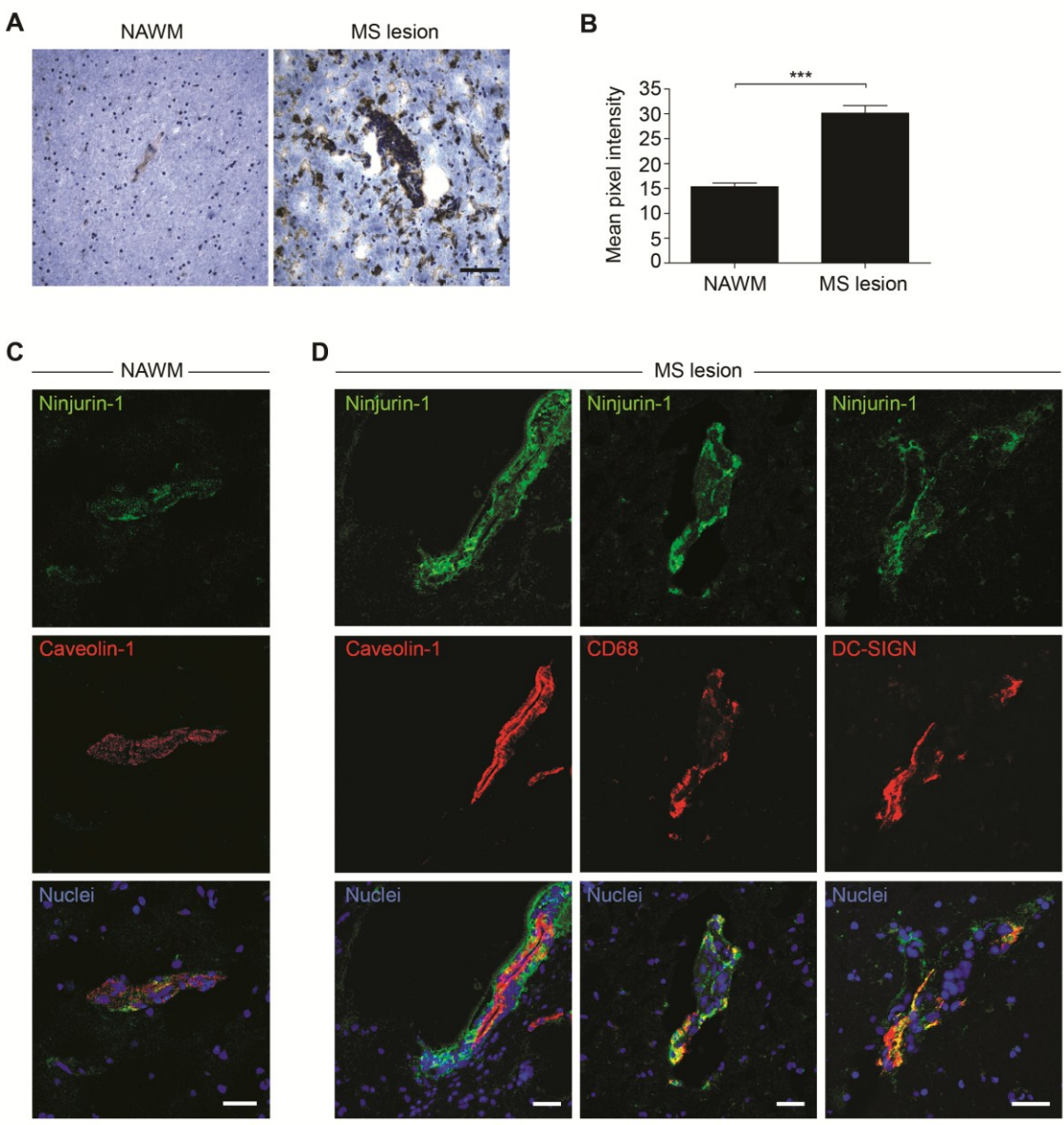


Figure 4. Ninjurin-1 blockade restricts CD14⁺ monocyte adhesion and migration across human BBB-ECs

(A) CFSE-labeled human CD14⁺ monocytes (green) were seeded on a confluent monolayer of TNF + IFN- γ -activated human BBB-ECs, fixed and immunostained for Ninjurin-1 (red, left panel). Z-stack reconstruction images (x-z and y-z axes, 15 μ m) show Ninjurin-1 (red, arrows) enriched around a CFSE-loaded migrating monocyte (green) and in the transmigratory cup (arrowheads). Photomicrograph shown is representative of >20 fields obtained from $n = 4$ independent experiments. Scale bar, 10 μ m. (B) and (C) Human *ex vivo* CD14⁺ monocytes were allowed to migrate for 24 h across a monolayer of human BBB-ECs pre-treated with (B) PBS, isotype control or anti-Ninjurin-1 blocking Ab (each 10 μ g/ml), (C) PBS, scramble or Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptides (each 0.4 mM). Ninjurin-1 blockade significantly restricts the migration of CD14⁺ monocytes across BBB-ECs. Data shown are representative of seven independent experiments ($n = 7$ blood donors) performed in triplicate using six distinct BBB-EC preparations (***, $p < 0.001$). (D to G) Monocyte-BBB-EC interactions were analyzed under physiologic shear stress conditions. BBB-ECs and CFSE-labeled human CD14⁺ monocytes were pre-treated for one hour with (D and F) PBS, isotype control or anti-Ninjurin-1 blocking Ab, or with (E and G) PBS, scramble peptide or Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide. (D and E) Thirty sec videos were acquired at 5 min and 20 min after addition of monocytes to BBB-ECs under laminar flow conditions. Each dot represents the mean velocity of a single CFSE⁺ cell throughout the field of view. The horizontal bars are representative of the mean per data set (blue for control and red for Ninjurin-1 blocking). For each experiment, 3 videos per time-point were analysed. (F and G) Pictures of adherent CD14⁺ monocytes were captured between 0–5 min and 30–60 min after addition of monocytes to BBB-ECs under laminar flow conditions. For each recording interval, 15 pictures were taken randomly. Horizontal bars are representative of the mean per data set. Ninjurin-1 blockade significantly restricts the adhesion of CD14⁺ monocytes on BBB-ECs. Data shown in D to G are representative of four independent experiments ($n = 4$ blood donors each; ***, $p < 0.001$).

Figure 4

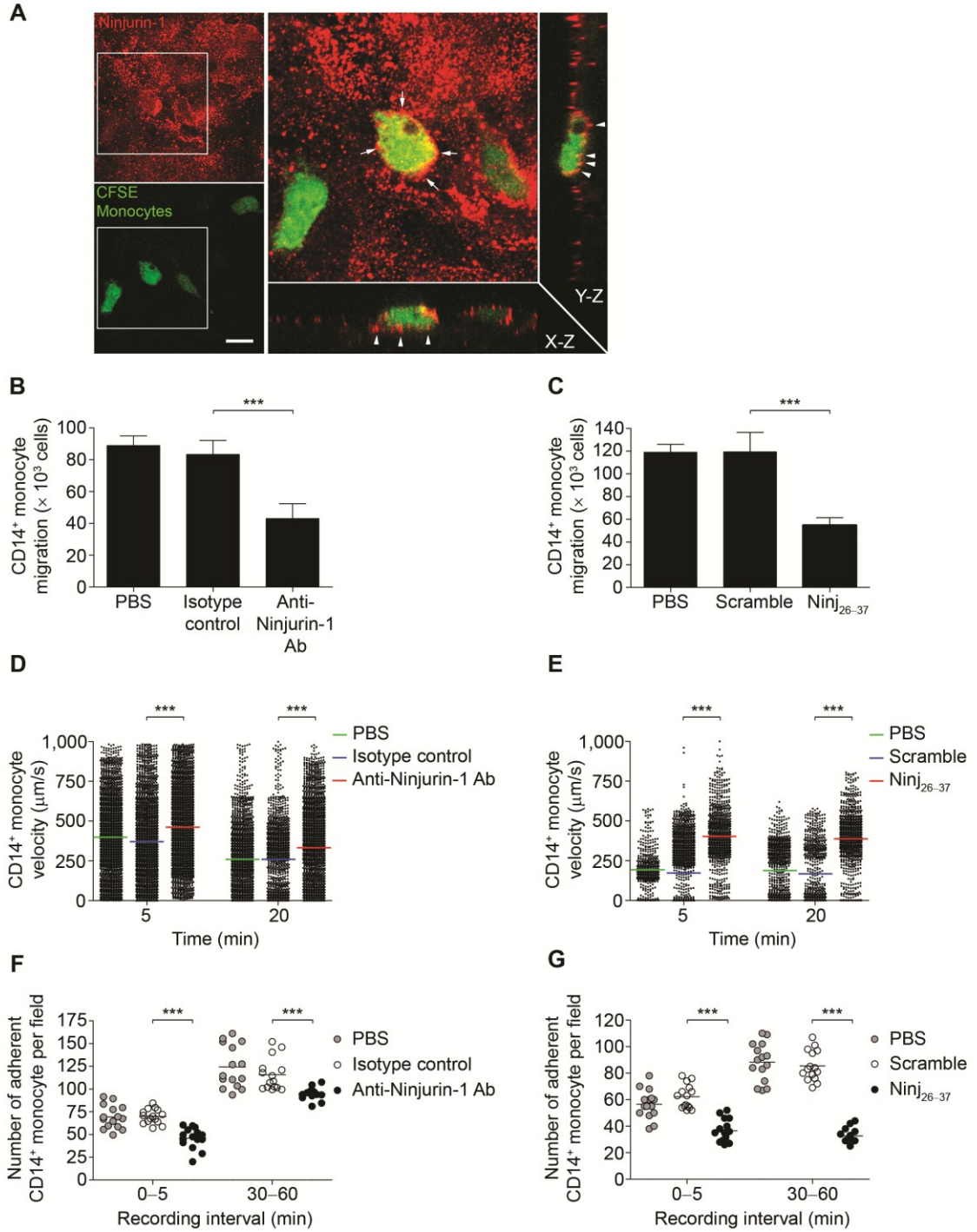
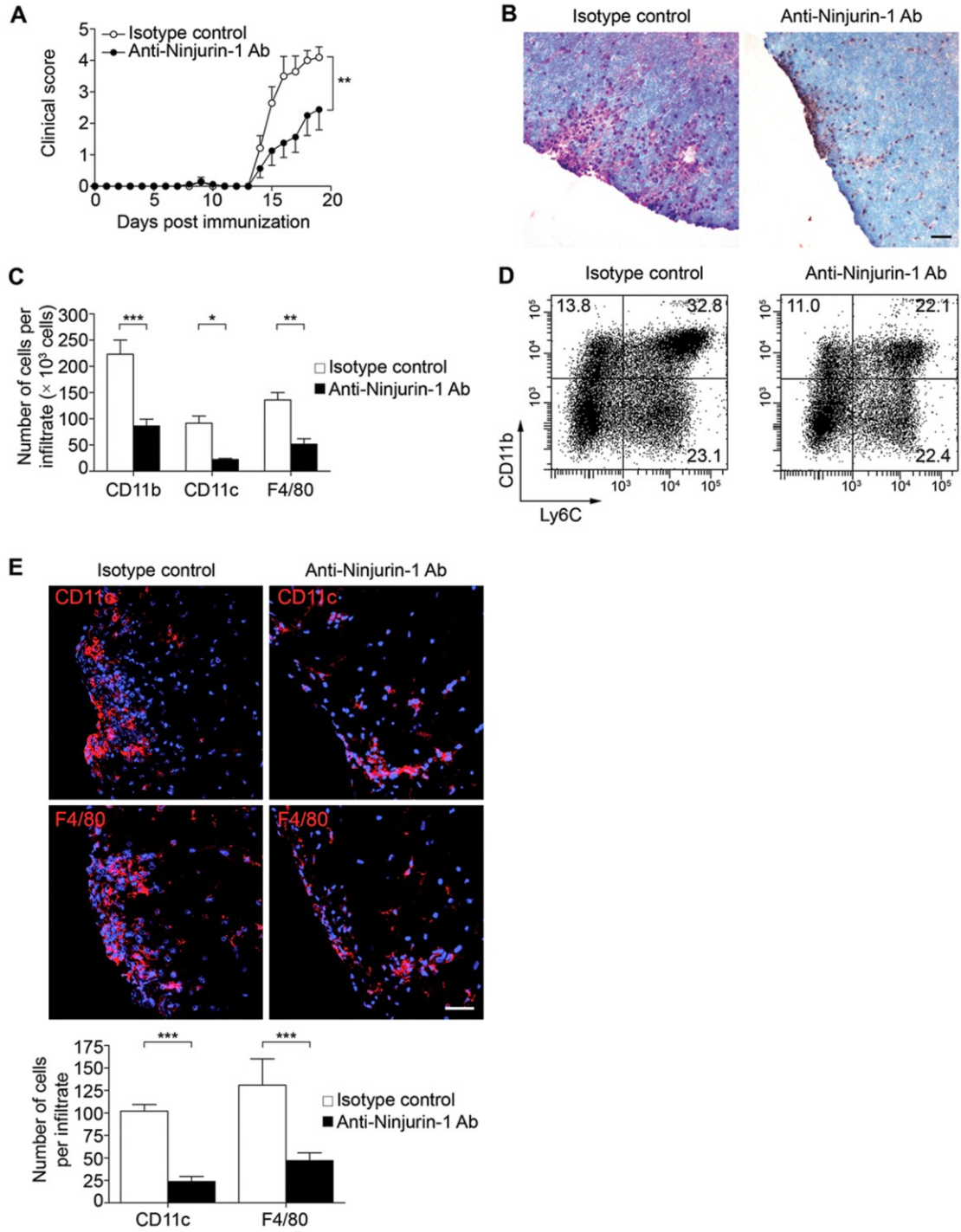


Figure 5. *In vivo* blockade of Ninjurin-1 improves EAE clinical scores and reduces infiltration of APCs

EAE was induced in C57BL/6 animals by active immunization with MOG_{35–55} (in CFA with PTX). Anti-Ninjurin-1 blocking Ab or isotype control (150 µg) were injected *i.p.* on day 4, 6, 8 and 10 post-induction ($n = 8$ mice). (A) Mice treated with anti-Ninjurin-1 Ab (●) show a significant reduction in clinical scores as compared to control animals (○) (**, $p < 0.01$). (B) Luxol fast blue-hematoxylin and eosin stainings of EAE spinal cord from Ninjurin-1–treated mice (16 days post-immunization) show a reduction in immune cell infiltration and demyelination, as compared to the control group. Photomicrographs shown are representative of >20 stainings performed on four animals. Scale bar, 50 µm. (C) Number of CD45^{hi} CD11b⁺ cells, CD45^{hi} CD11b⁺ CD11c⁺ DCs, CD45^{hi} CD11b⁺ F4/80⁺ macrophages, CD3⁺ CD4⁺ and CD3⁺ CD8⁺ T lymphocytes in the CNS of EAE mice treated with anti-Ninjurin-1 Ab (black bars), or isotype control Ab (white bars) ($n = 3$ mice per group; *, $p < 0.05$, **, $p < 0.01$, ***, $p < 0.001$). (D) Proportion of CD11b⁺ Ly6C⁺ inflammatory APCs is reduced in the CNS (brain and spinal cord homogenates) of MOG_{35–55}–immunized mice treated with anti-Ninjurin-1 Ab (right panel), as compared to isotype-treated animals (left panel). Data shown are representative of $n = 2$ independent experiments obtained from four mice. (E) Spinal cord sections from EAE mice treated with anti-Ninjurin-1 Ab or isotype control were immunostained for CD11c⁺ (red) and F4/80⁺ (red). Nuclei were stained with TO-PRO-3 (blue). Visual quantification (lower histogram) revealed a significant reduction in the infiltration of CD11c⁺ DCs and F4/80⁺ macrophages in anti-Ninjurin-1 Ab-treated animals (black bars), as compared to isotype-treated controls (white bars). Photomicrographs shown are representative of >20 immunostainings performed on post-mortem material from 4 animals. Scale bar, 30 µm (***, $p < 0.001$).

Figure 5



SUPPLEMENTAL INFORMATION**ROLE OF NINJURIN-1 IN THE MIGRATION OF MYELOID CELLS
TO CNS INFLAMMATORY LESIONS**

Igal Ifergan*, Hania Kebir*, Simone Terouz, Jorge I. Alvarez, Marc-André Lécuyer, Steve Gendron, Lyne Bourbonnière, Ildiko R. Dunay, Alain Bouthillier, Robert Moumdjian, Adriano Fontana, Arsalan Haqqani, Armelle Klopstein, Marco Prinz, Rubèn López-Vales, Thomas Birchler, and Alexandre Prat

*Note: Igal Ifergan and Hania Kebir contributed equally to the work

INVENTORY OF SUPPLEMENTAL INFORMATION

1. Supplemental Experimental Procedures
2. Supplemental Figure Legends

SUPPLEMENTARY MATERIALS AND METHODS

***In vitro* Generation of Macrophages and DCs**

To generate macrophages and mature DCs, PBMCs were allowed to adhere for 2 h at 37°C in RPMI 1640 (Wisent) with 5% human serum (Sigma). For macrophages, adherent cells were harvested after 8 days. To induce DC formation, medium was supplemented with 20 ng/ml GM-CSF (BD Biosciences) and 10 ng/ml IL-4 (R&D Systems). After 7 days, 100 ng/ml LPS from *E. coli* serotype 0111:B4 (Sigma) were added. Mature DCs were harvested 2 days later.

Human and Mouse T Lymphocyte Proliferation Assay

PBMCs, CD4⁺CD45RO⁺ memory T cells and CD14⁺ monocytes were isolated from consenting healthy donors, as previously described¹. PBMCs or CD4⁺CD45RO⁺ were incubated for 10 min at 37°C with 5 mM CFSE (Invitrogen). CFSE labeling was quenched with human serum. PBMCs were activated with anti-human CD3 Ab (2.5 µg/ml, clone OKT3, eBioscience) and recombinant human IL-2 (20 U/ml, BD Biosciences). CFSE labeled-CD4⁺CD45RO⁺ cells were activated by adding CD14⁺ monocytes and HA₃₀₆₋₃₁₈ peptide (30 mg/ml). Cells were cultured for 6 days in RPMI 1640 with 5% human serum in the presence of scramble peptide (0.4 mM), Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide (0.4 mM), isotype control (10 µg/ml) or anti-Ninjurin-1 blocking Ab (10 µg/ml, from R&D Systems).

For mouse proliferation assays, spleen and lymph nodes were collected from EAE animals 7 days post-induction, prepared as described, combined and labeled with CFSE. Cells were cultured for 2 days in RPMI 1640 with 10% FBS in the presence of 15 µg/ml MOG₃₅₋₅₅, 2.5 ng/ml recombinant mouse IL-12, 20 ng/ml recombinant mouse IL-23 and anti-Ninjurin-1 blocking Ab (10 µg/ml, from R&D Systems), Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide (0.4 mM) or appropriate control.

Flow Cytometry

Human *ex vivo* and cultured cells were harvested, resuspended in FACS buffer and incubated at 4°C for 15 min with 10% human serum to prevent unspecific antibody binding. Cells were incubated for 1 h at 4°C with monoclonal mouse anti-Ninjurin-1 Ab (20 µg/ml, BD Biosciences), or with mouse IgG2a isotype control (20 µg/ml, eBioscience). This monoclonal antibody has been used in other studies for flow cytometry², Western blot³⁻⁵ and immunostains^{6,7} analysis of Ninjurin-1 and has been tested by BD Biosciences for applications such as Western blot, immunofluorescence and immunohistochemistry. Cells were then incubated for 30 min at 4°C with secondary goat anti-mouse Ab conjugated with allophycocyanin (APC; 2 µg/ml, BD Biosciences). Cells were counter-stained for 30 min at 4°C with Abs or with corresponding isotype controls (all from BD Biosciences).

For murine cells, mouse monoclonal anti-Ninjurin-1 Ab (BD Biosciences) was biotinylated using the Melon Gel IgG Spin Purification Kit according to the manufacturer's instructions (Thermo Scientific). Cells were incubated for 1 h at 4°C with biotinylated anti-Ninjurin-1 Ab (5 µg/ml), or with biotin-conjugated IgG2a isotype control (5 µg/ml, eBioscience). Cells were then incubated for 30 min at 4°C with streptavidin-APC (2 µg/ml, BD Biosciences).

Western Blot

Ex vivo CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺, CD19⁺ cells, primary cultures of BBB-ECs and CNS material from EAE animals were lysed in denaturing buffer (0.1% SDS in 50 mM Tris-HCl pH 8.5) with Proteinase Inhibitor Cocktail BD BaculoGold™ (BD Biosciences), and sonicated using the Vibra Cell™ ultrasonic processor (Sonics & Materials Inc). Twenty µg of proteins were separated on a 12% SDS-PAGE gel and transferred to an Immun-Blot™ PVDF membrane (Bio-Rad Laboratories). Membranes were incubated overnight at 4°C with a mouse anti-Ninjurin-1 Ab (1:150; BD Biosciences) and detected with a peroxidase-conjugated rabbit anti-mouse Ab (1:1000; DakoCytomation). Mouse anti-β-actin (1:20000; Sigma) or anti-β-tubulin (Abcam) Abs were used as loading controls. HepG2 cell lysate was used as a positive control for Ninjurin-1 expression.

Immunocytofluorescence

Primary cultures of BBB-ECs were grown in 0.5% gelatin-coated chamber slides (5×10^4 cells/well) (Thermo Scientific) in the presence of 40% ACM until they reached confluency. Cells were fixed with paraformaldehyde 4% for 5 min, incubated for 30 min with 10% donkey serum and then for 1 h with sheep anti-Ninjurin-1 Ab (1:100, from R&D Systems). Donkey anti sheep Ab-Alexa 488 (1:400, Jackson Immunoresearch) was added for 40 min and slides were mounted with Gelvatol containing TO-PRO-3 (1:300; Invitrogen). Cells were imaged using a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems).

Ninjurin-1 mediated binding between human CD14⁺ monocytes and primary cultures of BBB-ECs was assessed using the vital dye CFSE. BBB-ECs were treated with TNF and IFN- γ (100 U/ml each) for 8 h. CD14⁺ monocytes were isolated as described, and labeled with CFSE. CD14⁺ monocytes were added to BBB-ECs for 2 h at 37°C at a 1:1 ratio. Cells were then processed for immunostaining and imaged using a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems).

Immunohistochemistry

The degree of immune cell infiltration and demyelination was determined on human and mouse brain specimens obtained from MS patients (autopsy) and EAE animals by Luxol Fast Blue-Hematoxylin-Eosin stainings as previously described^{1,8-10}. Brain tissue was obtained from 3 patients with clinically diagnosed and neuropathologically confirmed MS. Autopsy samples were immediately frozen in liquid nitrogen. Three cases without neurological disease were selected as controls. All patients and controls had given informed consent before autopsy to use their brain tissue for research purposes. Ethic approval was granted by the CHUM Research Center scientific and ethic committees to use human brain obtained from MS and other neurological and non-neurological diseases (BH 07.001). Sections showing acute demyelinating lesions and active perivascular mononuclear cell infiltration were selected (3 donors: 8–12 blocks per donor), and compared to NAWM from the same donors and to non-neurological disease controls (3 donors; 4–6 blocks per donor). Mean age was 49 ± 6 years and disease duration ranged from 3 to 23 years. Cause of death

was pneumonia (1), urosepsis (1) and barbiturate intoxication (1). CNS material from EAE animals was collected following rapid intra-cardiac PBS perfusion and snap-frozen in liquid nitrogen. Human and murine tissues were cryosectioned (7 μm thick), mounted on superfrost slides (Thermo Scientific), fixed in -20°C acetone for 10 min and hydrated in PBS. Endogenous biotin was blocked with the Avidin/Biotin blocking kit (Invitrogen) if required. Non-specific immunoglobulin binding was blocked with 10% donkey serum for 30 min. Sections were incubated 1 h with sheep anti-Ninjurin-1 Ab (1:100 for human and 1:30 for mouse, from R&D Systems), followed by 40 min incubation with donkey anti-sheep Ab conjugated with Alexa 488 (1:400, Jackson ImmunoResearch). The second set of primary Abs (Human tissue: mouse anti-CD68 (1:100, Dako), mouse anti-DC-SIGN (1:50, BD Biosciences), and rabbit anti-Caveolin-1 (1:100, Santa Cruz Biotechnology). Mouse tissue: hamster anti-CD11c (1:30 when biotinylated or 1:100 for non-biotinylated, BD Biosciences), and rat anti-F4/80 (1:80, BioLegend)), were incubated with their respective secondary antibodies. All incubations were done at room temperature and negative controls were performed omitting the primary antibody. Fluorescence acquisition was done on a Leica SP5 confocal microscope.

Numbers of CD11c^{+} and F4/80^{+} cells in spinal cord were quantified in pictures of 15 random fields of the spinal cord (two mice per treatment group). All counts were made by two investigators blinded to the identity of the treatment group.

Mean pixel intensity was evaluated by ImageJ software of confocal pictures of brain vessels stained for Ninjurin-1. Two measurements of pixel intensity were taken per vessel, and 15 vessels from NAWM and active MS lesions were used to evaluate the mean pixel intensity of Ninjurin-1 expression for each condition.

Immunoperoxidase staining was performed after appropriate blocking of the sections with 10% donkey serum. Polyclonal sheep anti-Ninjurin-1 Ab (1:100, from R&D Systems) diluted in 3% donkey serum was added for 1 h, and washed 3 times with PBS. Peroxidase conjugated donkey anti-sheep Ab (1:500, Jackson ImmunoResearch) was incubated for 40 min, washed 3 times and the reaction was revealed with 3,3'-Diaminobenzidine (DAB) substrate-chromogen system (Dako) according to the

manufacturer's instructions. Bright field images were acquired on a Leica™ DM6000 B epifluorescent microscope equipped with a DFC480 digital camera and using Openlab™ 4.0.4 software (Improvision).

Quantitative Real Time PCR

RNA was extracted using TRIzol (Invitrogen) and RNeasy Lipid Tissue kit (Qiagen). Subsequently, RNA was reverse-transcribed using random hexamers (Roche) and M-MuLV reverse transcriptase (Applied biosystems). The cDNA equivalent to 20 ng of total RNA was PCR-amplified in an ABI PRISM HT7900 detection system (PE-Applied Biosystems) using the TaqMan Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems). Primers and probe for Ninjurin-1 were designed using the primer design software Primer Express™ (Perkin-Elmer) and are the following: 5'-CCAGAGAATGGTCACTGCCC-3' and 5'-GCTGGCCCCTCGTCAAGT-3'; and probe: 5'-FAM-CAAGGACATGCAGCAAATCCATGAT-TAMRA-3'. Ninjurin-1 primers were used at 400 nM each and the probe was used at 250 nM. The relative levels of mRNA were calculated by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method; GAPDH was used as a housekeeping gene. Each Ct value used for these calculations is the mean of two duplicates of the same reaction. Relative RNA levels are expressed as x-fold variations compared to untreated.

***In vitro* Model of the BBB**

BBB-ECs were treated with the scramble peptide (0.4 mM), human Ninj₂₆₋₃₇ peptide (0.4 mM), isotype control (10 µg/ml) or anti-Ninjurin-1 blocking Ab (10 µg/ml, both from R&D Systems) 1 h prior to the addition of leukocytes. Leukocytes were added to the upper chamber (1×10^6 cells/chamber) and were allowed to migrate across the ECs for 24 h. Migrating leukocytes were recovered from the lower chamber and counted manually. All migration data shown represent at least three independent experiments performed in triplicate.

Flow System

Human BBB-ECs (2.5×10^5 cells/slide) were cultured on μ -slideTM of 0.6 mm (Ibidi Integrated BioDiagnostics) for 4 days to reach confluency. The μ -slideTM was then placed inside a live chamber (37°C and 5% CO₂) and was connected to the flow system with a 50 cm long perfusion set tubing (aperture diameter of 0.8 mm) from both sides of the μ -slide with a 90° angled connector. The fluidic unit contains also two reservoirs for the cell media. The control unit is connected to the fluidic unit by an electric cable and a tube for transducing the air pressure which drives the flow. The flow generated by the Ibidi pump system was controlled via the Ibidi pump control software (Ibidi Integrated BioDiagnostics). Flow in the μ -slide channel is generated by applying pressured air to the reservoirs of the fluidic unit. In order to avoid mechanical activation of immune cells, the media is pumped back and forth from one reservoir to the other one by switching a four-fold valve. And to generate a unidirectional flow, a fluidic rectifier is placed between the reservoirs and the μ -slide allowing a continuous and unidirectional flow. BBB-ECs were treated with the scramble peptide, human Ninj₂₆₋₃₇ peptide, isotype control or anti-Ninjurin-1 blocking Ab 1 h (both from R&D Systems) prior to the addition of monocytes in a volume of 4 ml with a constant flow (applied air pressure: -3.7 mbar, flow rate: 0.43 ml/min, shear stress: 0.56 dyn/cm², shear rate: 27 γ /sec, cycle duration: 120 sec, unidirectional flow). Human monocytes labeled with CFSE (5×10^6) were added to the flow system. Pictures to evaluate the number of adherent cells were taken using a Leica DMI-6000 inverted microscope focused on BBB-ECs. Pictures were captured between 0–5 min and 30–60 min after addition of monocytes to BBB-ECs, and for each recording interval, 15 pictures were taken randomly. The cell velocity was evaluated using a Hamamatsu ORCA-ER digital camera combined with the Impovisation Volocity software v5.3.1. Image capture and live time-lapse acquisition videos were recorded at constant intervals for 60 min. For each experiment, 3 real-time videos of 30 sec were acquired at 5 min and 20 min after addition of monocytes to BBB-ECs.

Mouse Tissue Processing and Number of Lineage Marker-Positive Cells Recovered from the CNS

Following rapid intra-cardiac PBS perfusion, the spleen, spinal cord and brain were removed and kept on ice. The organs were separately mashed (except for brain and spinal cord) and passed through a 70 μm cell strainer to make single cell suspensions. Splenocytes were treated with 0.83% ammonium chloride for 3 min at room temperature to lyse red blood cells. Cells were then passed again through another 70 μm cell strainer. CNS cells were isolated by density gradient centrifugation using PercollTM (Amersham Biosciences AB).

The number of CD45^{hi} CD11b⁺ cells, CD45^{hi} CD11b⁺ CD11c⁺ DCs, CD45^{hi} CD11b⁺ F4/80⁺ macrophages, CD3⁺ CD4⁺ and CD3⁺ CD8⁺ T lymphocytes in the CNS was determined by multiplying the percentage of lineage marker-positive cells detected by flow cytometry with the total number of mononuclear cells isolated from the CNS. FACS analyses of the CNS content were performed on 3 different mice per group, 16 days post-immunization.

REFERENCES

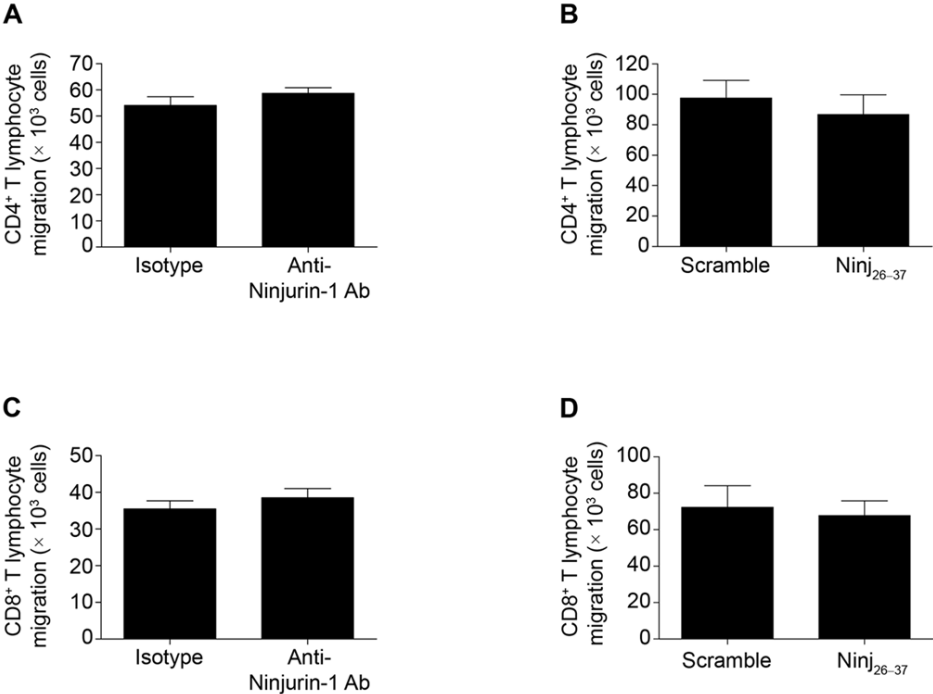
1. Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med.* 2007; 13:1173-1175.
2. Chen JS, Coustan-Smith E, Suzuki T, et al. Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood.* 2001; 97:2115-2120.
3. Warters RL, Packard AT, Kramer GF, et al. Differential gene expression in primary human skin keratinocytes and fibroblasts in response to ionizing radiation. *Radiat Res.* 2009; 172:82-95.
4. Ahn BJ, Lee HJ, Shin MW, et al. Ninjurin1 is expressed in myeloid cells and mediates endothelium adhesion in the brains of EAE rats. *Biochem Biophys Res Commun.* 2009; 387:321-325.
5. Lee HJ, Ahn BJ, Shin MW, et al. Ninjurin1 mediates macrophage-induced programmed cell death during early ocular development. *Cell Death Differ.* 2009; 16:1395-1407.
6. Mhaweche-Fauceglia P, Ali L, Cheney RT, et al. Prognostic significance of neuron-associated protein expression in non-muscle-invasive urothelial bladder cancer. *J Clin Pathol.* 2009; 62:710-714.
7. Sanchez-Carbayo M, Socci ND, Lozano JJ, et al. Gene discovery in bladder cancer progression using cDNA microarrays. *Am J Pathol.* 2003; 163:505-516.
8. Cayrol R, Wosik K, Berard JL, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol.* 2008; 9:137-145.

9. Ifergan I, Kebir H, Bernard M, et al. The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain*. 2008; 131:785-799.
10. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing T H 17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2009; 66:390-402.

SUPPLEMENTARY FIGURE LEGENDS

Supplementary Figure 1. Ninjurin-1 blockade does not inhibit migration of human lymphocytes across the BBB. (A) and (B) Human *ex vivo* CD4⁺ and (C) and (D) CD8⁺ T lymphocytes were allowed to migrate across a monolayer of human BBB-ECs for 24 h in the presence of (A) and (C) isotype control or anti-Ninjurin-1 blocking Ab (each 10 µg/ml), (B) and (D) scramble peptide or Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptides (each 0.4 mM). Ninjurin-1 blockade did not affect the migration of CD4⁺ or CD8⁺ T cells across BBB-ECs. Data shown are representative of seven independent experiments (*n* = 7 blood donors) performed in triplicate using six distinct BBB-EC preparations.

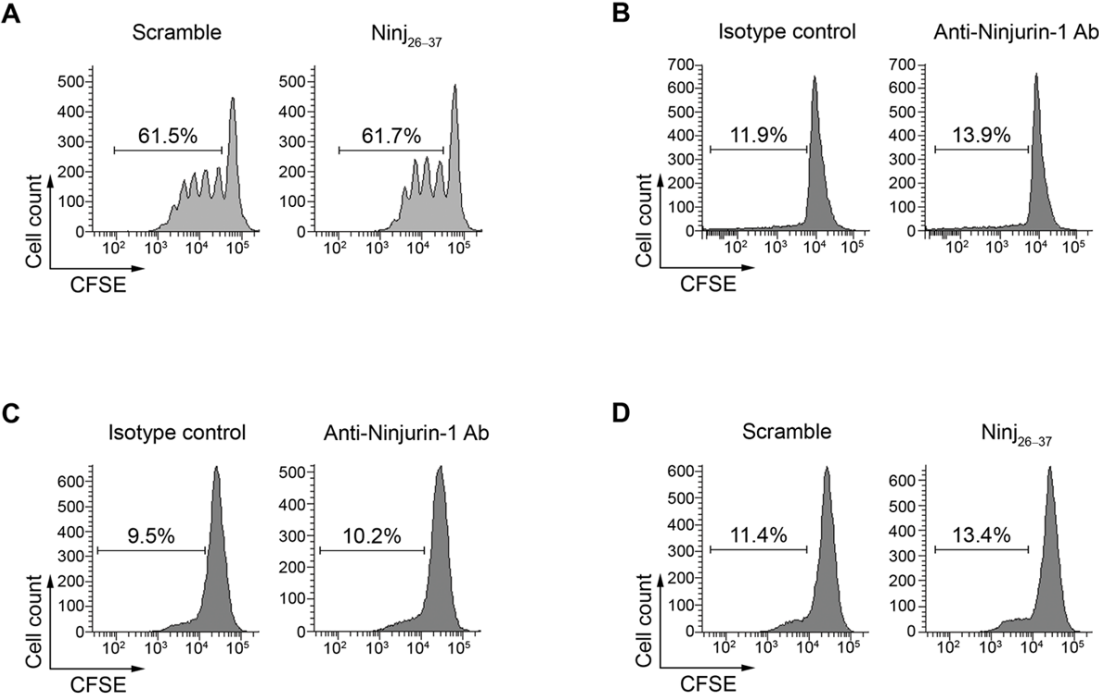
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2. Ninjurin-1 neutralization does not affect T cell proliferation.

(A) Peripheral blood mononuclear cells loaded with vital dye CFSE were cultured for 6 days with anti-CD3 Ab and recombinant IL-2 in the presence of scramble peptide or Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide (0.4 mM). Gating was performed on CD3⁺ CD4⁺ cells and proliferation was assessed by flow cytometry. No difference in cell proliferation was detected between scramble (left panel) and Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide conditions (right panel). (B) Memory CD4⁺ CD45RO⁺ lymphocytes loaded with vital dye CFSE were cultured for 6 days with CD14⁺ monocytes (ratio of 2 T cells for 1 monocyte) + hemagglutinin (HA)₃₀₆₋₃₁₈ peptide, in the presence of isotype control or anti-Ninjurin-1 blocking antibody (Ab) (10 µg/ml). Gating was performed on CD3⁺ CD4⁺ cells and proliferation was assessed by flow cytometry. No difference in proliferation was detected between isotype control (left panel) and anti-Ninjurin-1 Ab conditions (right panel). Data shown are representative of three independent experiments performed with the blood of healthy donors ($n = 3$). (C and D) Cells from spleen and lymph nodes collected from EAE mice (7 days post-induction) were loaded with CFSE and cultured for 2 days with MOG₃₅₋₅₅, recombinant mouse IL-12, recombinant mouse IL-23 in the presence of (C) anti-Ninjurin-1 blocking Ab (or isotype control, 10 µg/ml) or (D) Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide (or scramble 0.4 mM). Gating was performed on CD3⁺ CD4⁺ cells and proliferation was assessed by flow cytometry. No difference in proliferation was detected between the Ninjurin-1 blocking groups and control groups. Data shown are representative of three independent experiments ($n = 3$).

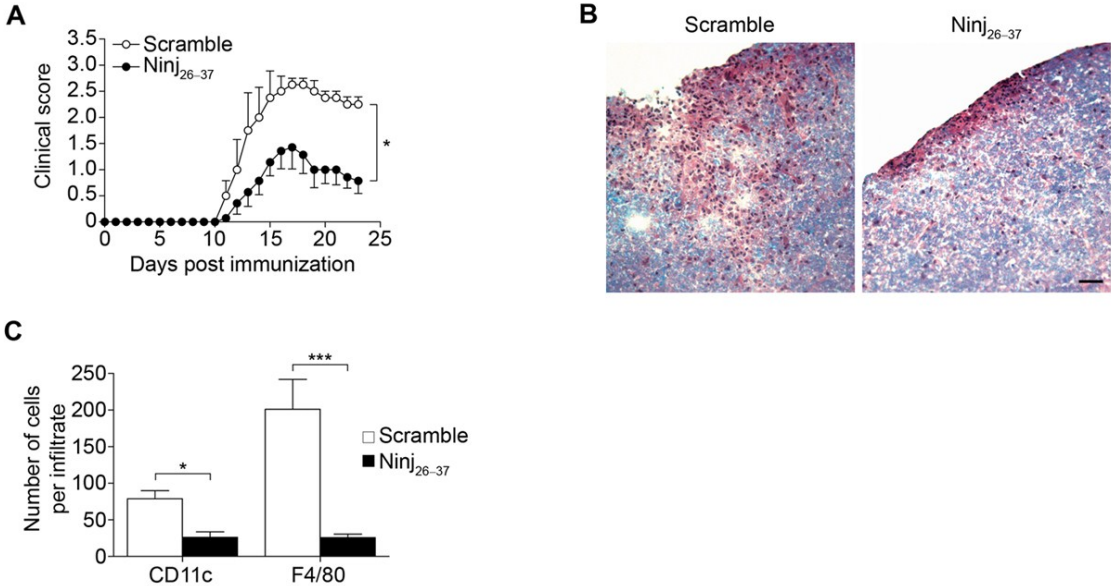
Supplementary Figure 2



Supplementary Figure 3. Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide improves clinical scores of EAE and reduces infiltration of myeloid cells into the CNS.

EAE was induced by active immunization with MOG₃₅₋₅₅ and Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide or scramble (200 µg twice daily) were injected *i.p.* from day 3 to 23 post-immunization ($n = 8$ mice). (A) Mice treated with Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide (●) display a significant reduction in clinical scores as compared to scramble-treated animals (○). (B) Luxol fast blue-hematoxylin and eosin stainings in spinal cords from Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide-treated mice (14 days post-immunization) show a reduction in immune cell infiltration and demyelination, as compared to the scramble peptide control group. Photomicrographs shown are representative of >20 stainings performed on four animals. Scale bar, 50 µm. (C) Cell counts of CD11c⁺ and F4/80⁺ cells in spinal cord sections confirmed the significant reduction of infiltrating myeloid cells in Ninj₂₆₋₃₇ blocking peptide-treated mice (black bars), as compared to scramble peptide-treated animals (white bars) ($n = 4$; *, $p < 0.05$; ***, $p < 0.001$).

Supplementary Figure 3



Article 4: CNS Recruitment of Effector Memory CD8⁺ T Lymphocytes During Neuroinflammation is Dependent on α 4 Integrin

Igal Ifergan, Hania Kebir, Jorge I. Alvarez, Gabriel Marceau, Monique Bernard, Lyne Bourbonnière, Josée Poirier, Pierre Duquette, Pierre J. Talbot, Nathalie Arbour and Alexandre Prat

Accepté pour publication dans: Brain, 2011 Dec; 134 (Pt 12): 3560-3577

Contributions

Les expériences d'EAE ont été réalisées par Hania Kebir et moi-même. Les expériences avec le virus MHV-A59 ont été effectuées par Gabriel Marceau, Pierre Talbot et moi-même. Jorge Alvarez a aidé pour la mise au point des immunostains. Monique Bernard et Lyne Bourbonnière ont apporté leur soutien dans de nombreuses étapes de plusieurs expériences. La vaste majorité des autres expériences ont été effectuée par moi-même. Les cellules endothéliales ont été préparées par Hania Kebir, Jorge Alvarez, Monique Bernard et moi-même. Et de façon régulière, le Dr. Nathalie Arbour nous donnait son avis scientifique sur le projet. Le manuscrit a été écrit par Dr. Alexandre Prat, Hania Kebir, et moi-même.

**CNS Recruitment of Effector Memory CD8⁺ T Lymphocytes
During Neuroinflammation is Dependent on α 4 Integrin**

**Igal Ifergan¹, Hania Kebir¹, Jorge I. Alvarez¹, Gabriel Marceau², Monique Bernard¹,
Lyne Bourbonnière¹, Josée Poirier³, Pierre Duquette³, Pierre J. Talbot², Nathalie
Arbour¹ and Alexandre Prat^{1,3}**

1-Neuroimmunology Research Unit, Center for Excellence in Neuromics, CRCHUM-Notre-Dame Hospital, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

2-Laboratory of Neuroimmunovirology, INRS-Institut Armand-Frappier, Laval, Québec, Canada.

3-Multiple Sclerosis Clinic, Department of Neurology, Faculty of Medicine, CHUM-Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, Canada.

Short title: CD8 T lymphocytes in neuroinflammation

Page number: 45

Figures: 6

Supplementary figures: 4

Tables: none

Manuscript character count: 7245

Abstract word count: 238

Keywords: Multiple sclerosis, blood-brain barrier, CD8 T lymphocytes, alpha-4 integrin, migration

Corresponding author:

Alexandre Prat, MD PhD

Multiple Sclerosis Clinic and Neuroimmunology Research Unit

CHUM–Notre-Dame Hospital

1560 Sherbrooke Street East, Room Y-3608

Montréal, Québec, H2L 4M1, Canada.

Abstract

Clonally expanded CD8⁺ T lymphocytes are present in multiple sclerosis (MS) lesions, as well as in the cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients. In experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), CD8⁺ T lymphocytes are found in spinal cord and brainstem lesions. However the exact phenotype of CNS-infiltrating CD8⁺ lymphocytes and the mechanism by which these cells cross the blood-brain barrier (BBB) remain largely unknown. Using CSF from MS patients, spinal cord from EAE and coronavirus-induced encephalitis, we demonstrate that CNS-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes are mostly of the effector memory (EM) phenotype (CD62L⁻ CCR7⁻ granzymeB^{hi}). We further show that purified human EM CD8⁺ T lymphocytes transmigrate more readily across BBB-endothelial cells (ECs) than non-EM CD8⁺ T lymphocytes, and that BBB endothelium promotes the selective recruitment of EM CD8⁺ T lymphocytes. Furthermore, we provide evidence for the recruitment of IFN- γ - and IL-17-secreting CD8⁺ T lymphocytes by human and mouse BBB endothelium. Finally we show that *in vitro* migration of CD8⁺ T lymphocytes across BBB-ECs is dependent on α 4 integrin, but independent of ICAM-1/LFA-1, ALCAM/CD6 and the chemokine MCP-1/CCL2. We also demonstrate that *in vivo* neutralization of VLA-4 restricts infiltration of CD8⁺ T lymphocytes in active immunization and adoptive transfer EAE, and in coronavirus-induced encephalitis. Our study thus demonstrates an active role of the BBB in the recruitment of EM CD8⁺ T lymphocytes to the CNS compartment and defines α 4 integrin as a major contributor of CD8⁺ T lymphocyte entry into the brain.

INTRODUCTION

Multiple sclerosis (MS) is a central nervous system (CNS)-directed inflammatory disease characterized by destruction of the myelin sheath, axonal loss and immune cell infiltration. Perivascular immune cell infiltrates found in active MS lesions are dominated by CD4⁺ T lymphocytes, antigen-presenting cells (APCs) and CD8⁺ T lymphocytes (McFarland and Martin, 2007; Sospedra and Martin, 2005). The pathogenic contribution of CD4⁺ T lymphocytes in MS has been extensively documented and is supported by the association between susceptibility to MS and major histocompatibility complex (MHC)-II genes (Ebers *et al.*, 1996; Haines *et al.*, 1996; Oksenberg and Hauser, 2005; Sawcer *et al.*, 1996), as well as by data demonstrating transfer of disease by myelin-reactive CD4⁺ T lymphocytes in the animal model of MS, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). In that regard, studies in EAE have shown a crucial role for both T_{H1} and T_{H17} CD4⁺ T lymphocytes in the initiation and progression of EAE (Becher *et al.*, 2003; Kebir *et al.*, 2007; Kroenke *et al.*, 2008; Langrish *et al.*, 2005; Stromnes *et al.*, 2008). Meanwhile, very little is known about the phenotype, the origin and the route of entry of CD8⁺ T lymphocytes found in MS or EAE lesions.

The exact role of CD8⁺ T lymphocytes in autoimmune CNS inflammation remains controversial, and recent evidence supports both pathogenic and protective roles for CD8⁺ T lymphocytes in MS and in EAE. In favor of the pathogenic contribution of CD8⁺ T lymphocytes, oligoclonally-expanded CD8⁺ T cells were detected in demyelinated MS tissue (Babbe *et al.*, 2000), suggesting CNS antigen reactivity and CD8-dependent lytic functions. CD8⁺ T cells have also been found closely associated with demyelinated axons in MS brain tissue (Neumann *et al.*, 2002a) and these cells were shown to interact with neural cells in an NKG2D-MICA-dependent manner (Saikali *et al.*, 2007a). Recently, several groups have also developed models of CD8⁺ T lymphocyte-dependent EAE-like disease (Cabarrocas *et al.*, 2003; Huseby *et al.*, 2001; Saxena *et al.*, 2008; Sun *et al.*, 2001; Zehntner *et al.*, 2003), including those induced by transfer of myelin basic protein (MBP)₇₉₋₈₇ or myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)₃₅₋₅₅-specific CD8⁺ T lymphocytes in C3H and in C56BL/6 or RAG1^{-/-} animals, respectively (Huseby *et al.*, 2001; Sun *et al.*,

2001). Moreover, Cabarrocas *et al* were able to induce EAE-like disease by transferring hemagglutinin (HA)-specific CD8⁺ T lymphocytes into animals overexpressing HA on oligodendrocytes, demonstrating the lytic capacity of CNS-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes (Cabarrocas *et al.*, 2003). Conversely, several reports indicate that CD8⁺ T lymphocytes could play a regulatory role and protect against disease development (Friese and Fugger, 2005; Jiang *et al.*, 2001; Jiang *et al.*, 2003; Jiang *et al.*, 1992; Koh *et al.*, 1992; Linker *et al.*, 2005; York *et al.*, 2010a). These include the findings that β -2 microglobulin-deficient mice exhibit a significant more severe EAE than wild-type mice (Linker *et al.*, 2005). Moreover, Jiang *et al.* demonstrated that CD8⁺ T lymphocytes are able to dictate the phenotype of CD4⁺ T lymphocytes in the periphery of EAE mice by inducing more T_H2 cells (Jiang *et al.*, 2001). In addition, in an MBP-induced EAE model, CD8⁺ T lymphocytes down-regulated pathogenic MBP-reactive CD4⁺ T lymphocyte clones (Jiang *et al.*, 2003). Also, CD8⁺ T lymphocytes have been shown to prevent disease relapses (Jiang *et al.*, 1992; Koh *et al.*, 1992). Finally, the transfer of MOG₃₅₋₅₅-specific CD8⁺ T lymphocytes in mice suppresses the induction of EAE and inhibits ongoing EAE by a cytotoxic/suppressor mechanism (York *et al.*, 2010a). Therefore, the exact contribution of CD8⁺ T lymphocytes to the pathology of MS and EAE remains unresolved.

Under physiological conditions, a very limited number of peripheral blood (PB) immune cells cross the endothelial cells of the blood-brain barrier (BBB-ECs) and the meningeal vessels, in a process called immune surveillance of the CNS (Sospedra and Martin, 2005). During an inflammatory process, meningeal or BBB-ECs amplify the migration of immune cells to the CNS parenchyma, in a multi-step process that involves selectins, chemokines (and their receptors) and cell adhesion molecules (CAMs) (Springer, 1994). Leukocytes first undergo E- and P-selectin-mediated rolling along the surface of ECs (Kubes and Ward, 2000), followed by chemokine-mediated activation and firm adhesion to the endothelium (Engelhardt and Ransohoff, 2005). BBB-ECs and glial cells are an important source of pro-inflammatory chemokines CCL2/MCP-1, RANTES and CXCL10/IP-10 (Ifergan *et al.*, 2006), which are required for T_H1 and T_H17 lymphocyte and monocyte recruitment to the CNS (Engelhardt and Ransohoff, 2005; Mahad *et al.*, 2006;

Ransohoff *et al.*, 2003). Lastly and most importantly, upon activation with pro-inflammatory cytokines, BBB-ECs express CAMs such as intercellular adhesion molecule (ICAM)-1, vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 and activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM) which mediate, at least in part, the adhesion process and the transmigration of leukocytes to the CNS through their interaction with integrin α L β 2 (leukocyte function-associated antigen (LFA)-1), α 4 β 1 (very late leukocyte antigen (VLA)-4) and CD6, respectively (Biernacki *et al.*, 2001; Cayrol *et al.*, 2008; Greenwood *et al.*, 1995; Prat *et al.*, 2002; Wong *et al.*, 1999). Despite the ongoing controversy on the role of CD8⁺ T lymphocytes in MS and EAE, the exact phenotype of CD8⁺ T lymphocytes found in the inflamed brain and the molecular mechanism used by these CD8⁺ T lymphocytes to access the target organ remain incompletely understood.

In the current study, we demonstrate that human and mouse CD8⁺ T lymphocytes in the inflamed CNS compartment are mostly CD62L⁻ CCR7⁻ effector memory (EM) lymphocytes. We provide evidence that EM CD8⁺ T lymphocytes have a better propensity to migrate across human BBB-ECs than non-EM cells. We further show that early in EAE, CD8⁺ T lymphocytes infiltrating the CNS display more aggressive functions (granzyme B⁺ IFN- γ ^{hi}) than CD4⁺ T lymphocytes and that IFN- γ ⁻ and IL-17⁻-secreting CD8⁺ T lymphocytes migrate faster across human and mouse BBB-ECs, *in vitro* and *in vivo*, respectively. Finally, we show that the migration of CD8⁺ T lymphocytes across the BBB is mainly dependent on α 4 integrin, *in vitro* and *in vivo*.

MATERIAL AND METHODS

Patients

Seventeen untreated patients with relapsing remitting MS (RRMS) diagnosed according to McDonald's criteria (McDonald *et al.*, 2001) and 10 healthy volunteers were included in the study. Forty ml of blood and five ml of cerebrospinal fluid (CSF) were collected from MS patients for cell phenotype analysis. Informed consent, as approved by the local ethics committee, was given by each patient before blood and CSF collection (local ethic approval SL05.022 and 023). Mean age of MS patients and healthy controls (+/- the standard deviation) was 36.9 ± 9.5 years and 34.3 ± 10.2 years, respectively. For MS patients, disease duration and last year relapse rate were 5.22 years and 1.1 ± 0.3 , respectively.

Isolation and culture of BBB-ECs and astrocytes

CNS tissue was obtained from temporal lobe resection specimens from young adults undergoing surgery for the treatment of intractable epilepsy. Informed consent and ethics approval were given prior to surgery (ethics approval number BH 07.001). BBB-ECs were isolated from non-epileptic material according to our published protocol (Cayrol *et al.*, 2011; Ifergan *et al.*, 2008; Kebir *et al.*, 2009). In brief, meninges were removed and cortical and subcortical white matter material was minced (3mm^3), resuspended in pH 7.2 phosphate-buffered saline (PBS), and washed several times to remove blood. CNS material was then homogenized using 5 strokes of loose-fitting Dounce homogenizer at 40g and filtered on a $350\ \mu\text{m}$ pore size mesh (BSH Thompson, Montreal, Quebec, Canada). Filtrate was then passed twice through a $112\ \mu\text{m}$ pore size mesh, collected, and treated with collagenase type IV (2mg/ml; Sigma, Mississauga, Ontario, Canada) for 15 min at 37°C . After inactivation with fetal bovine serum (FBS; Sigma), filtrate was spun down and plated on 0.5% (v/v) gelatin-coated six-well plates in EC culture media composed of M199 cell culture media (Invitrogen, Burlington, On, Canada) supplemented with 10% (v/v) FBS, 20% (v/v) human normal serum (HS), insulin-transferrin-selenium, and EC growth supplement ($5\ \mu\text{g}/\text{ml}$) (all from Sigma, Oakville, ON, Canada) at 37°C in 5% CO_2 atmosphere. Two days after initial plating, wells were washed twice with PBS to remove

nonadherent cells, and fresh media was added. By days 5 to 7, colonies of ECs were visible; by day 20, human brain ECs from the microvessel fraction ($<112\mu\text{m}$) could be expanded in tissue culture flasks. As previously demonstrated, these cells express factor VIII, von Willebrand factor, Ulex Agglutenens Europaensis-1 binding sites, endothelial antigen HT-7; and are susceptible to tumor necrosis factor (TNF)-induced ICAM-1 and VCAM-1 upregulation. Immunoreactivity for glial fibrillary acidic protein (GFAP) and α -myosin was undetectable, confirming the absence of contaminating astrocytes and smooth muscle cells respectively (Biernacki *et al.*, 2001; Prat *et al.*, 2000; Prat *et al.*, 2001; Wosik *et al.*, 2007).

For astrocyte culture, human cerebral hemispheres from fetuses of 17-23 weeks of gestation were obtained from the Human Fetal Tissue Repository (Albert Einstein College of Medicine, Bronx, NY) following approved guidelines from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR). Astrocytes were cultured as previously described (Ifergan *et al.*, 2008) in complete DMEM media (Invitrogen) supplemented with 10% (v/v) FBS and express GFAP. Astrocyte-conditioned media (ACM) was harvested once a week from confluent flasks and added to the BBB-EC culture media when specified.

CD8⁺, CD8⁺ CD62L⁺ and CD8⁺ CD62L⁻ T lymphocyte isolation

Eighty ml venous blood samples were obtained from 10 consenting healthy donors, in accordance with institutional guidelines. PB mononuclear cells (PBMCs) were isolated from EDTA (ethylenediaminetetraacetic acid)-anticoagulated blood using standard Ficoll-Hypaque™ (Amersham Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden) density gradient centrifugation. CD8⁺ T lymphocytes were purified from PBMCs using magnetic cell sorting (MACS; Miltenyi Biotec, Auburn, California) according to the manufacturer's instructions. CD8⁺ T lymphocytes purity was $>97\%$ as assessed by flow cytometry using anti-CD8-fluorescein isothiocyanate (FITC), anti-CD4-phycoerythrin (PE) and anti-CD3-allophycocyanin (APC) (BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada).

CD62L⁺ and CD62L⁻ cells were purified from CD8⁺ T lymphocyte populations from 3 consenting healthy donors (obtained from a negative selection) using anti-CD62L-

PE antibodies and anti-PE immunobeads (MACS; Miltenyi Biotec). Purity of positively selected cells was consistently >95% as confirmed by flow cytometry.

Migration across BBB-ECs

BBB-ECs grown in primary cultures were used to generate an *in vitro* model of the human BBB, as previously published (Ifergan *et al.*, 2006; Kebir *et al.*, 2009). BBB-ECs were plated on gelatin-coated 3 micron pore size Boyden chambers (Collaborative Biomedical Products, Bedford, MA) at a density of 2.5×10^4 cells/well in EC culture media supplemented with 40% (v/v) ACM for 96 h, in order to allow them to reach confluency. The formation of a confluent monolayer was confirmed by hematoxylin-eosin (H&E) staining, as well as soluble tracer diffusion (Ifergan *et al.*, 2006). Media was removed, replaced with fresh EC media supplemented with 40% (v/v) ACM. Freshly purified human CD8⁺, CD8⁺ CD62L⁺ or CD8⁺ CD62L⁻ T lymphocytes were then added to the upper chamber and allowed to migrate for 24 h across BBB-ECs either untreated or pre-activated for 24 h with 100 U/ml interferon (IFN)- γ (1 U corresponding to 2 ng/ml) and 100 U/ml TNF- α (1 U corresponding to 0.05 ng/ml) (Biosource-Invitrogen, Carlsbad, CA). When applicable, migration experiments were performed in the presence of blocking antibodies or the corresponding isotype. We used anti-ICAM-1 (10 μ g/ml; clone BBIG-I1, R&D Systems, Minneapolis, MN), anti-VCAM-1 (10 μ g/ml; clone BBIG-V1, R&D Systems), anti-ALCAM (30 μ g/ml; Clone 105901, R&D Systems), anti-platelet endothelial cell adhesion molecule (PECAM)-1/CD31 (10 μ g/ml, clone WM59, Biolegend, San Diego, CA, USA), anti-MHC-I (15 μ g/ml; clone W6/32, eBioscience), anti-IL-8 (10 μ g/ml; clone 6217, R&D Systems), anti-monocyte chemotactic protein (MCP)-1, (10 μ g/ml; clone 23007, R&D Systems), anti- α L/CD11a (10 μ g/ml, clone H1111, Biolegend) and anti- α 4/CD49d (20 μ g/ml, clone 2B4, R&D Systems). All antibodies were applied to the upper chamber 30 min prior to the addition of immune cells. After 24 h, cells that had completely migrated through the BBB and cells remaining in the upper chamber were collected, counted and their profile was analyzed by flow cytometry. Migration experiments were done with 10 different blood donors, performed in triplicate on 7 distinct BBB-EC preparations

Endothelial cell death was assessed by flow cytometry, on two different preparations. In brief, 7-AAD (0.25 μg ; BD Biosciences) was added after detaching cells for 10 min to endothelial cells that had been exposed or not to purified CD8⁺ T cells for 24 h. The frequency of 7-AAD positive cells was assessed by gating on CD8⁻ cells.

Flow cytometric analyses

Human cells were phenotyped using antibodies specific for human CD3, CD4, CD8, CCR7, CD62L, granzyme B and perforin (all from BD Biosciences). Mouse cells were phenotyped using specific antibodies for mouse CD3 ϵ , CD4, CD8, CCR7, CD62L and granzyme B (all from BD Biosciences). Cells were stained for 30 min at 4°C, washed with FACS buffer containing PBS containing 1% (v/v) FBS and 0.1% (w/v) NaN₃ (Sigma). Cells were then fixed and permeabilized in 4% (w/v) paraformaldehyde (Sigma) with 0.1% (w/v) saponin in Hank's Balanced Salt Solution for 10 min at room temperature. Intracellular staining (ICS) was performed by incubating cells with antibodies against granzyme B and perforin for 30 min on ice in FACS buffer containing 0.1% (w/v) saponin, followed by two washes and resuspended in FACS buffer. Cells were acquired on a BD LSRII and analyzed using BD FACSDiva software.

For IFN- γ (clone B27, BD Biosciences) and IL-17 (clone eBio64DEC17, eBioscience, San Diego, CA) staining, cells were activated for 18 h with 1 $\mu\text{g}/\text{ml}$ ionomycin and 20 ng/ml phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in the presence of 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ brefeldin A (Sigma) for the last 6 h of co-culture. Cells were stained for surface markers and an ICS was performed.

Experimental allergic encephalomyelitis induction and scoring

Eight to nine week-old female C57BL/6 mice (Charles River, Montreal, Qc) were used to induce EAE by active immunization. Mice were injected subcutaneously with 200 μg of MOG₃₅₋₅₅ peptide (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX) emulsified in complete Freund's adjuvant (CFA) supplemented with 600 μg *Mycobacterium tuberculosis* (Difco, Detroit, MI). On day 0 and 2 after immunization, 500 ng pertussis toxin were administered intraperitoneally (i.p.). Mice were then injected i.p. on day 6, 9, 12, 15 and 18

with anti- $\alpha 4$ integrin (75 μ g; clone R1-2, monoclonal; BD Biosciences) or isotype control antibody (75 μ g of IgG2b clone A95-1, BD Biosciences). Two independent experiments were performed, one with 10 mice per group and another one with 12 mice per group. Clinical signs of EAE were assessed daily according to the following scores: 0, no clinical sign of disease; 1, limp tail; 2, hind limb weakness; 3, partial hind limb paralysis; 4, complete hind limb paralysis; 5, hind and fore limb paralysis. On day 8, 12 and 18 post-immunization, three to four mice of each group were perfused with PBS. Following rapid intra-cardiac PBS perfusion, the spleen, spinal cord and brain were removed and kept on ice. The organs were separately mashed (except for brain and spinal cord) and passed through a 70 μ m cell strainer to make single cell suspensions. Splenocytes were treated with 0.83% ammonium chloride for 3 min at room temperature to lyse red blood cells. Cells were then passed again through another 70 μ m cell strainer. CNS cells were isolated by density gradient centrifugation using PercollTM (Amersham Biosciences AB). The number of CD3⁺ CD4⁺ T lymphocytes and CD3⁺ CD8⁺ T lymphocytes were determined by multiplying the percentage of lineage marker-positive cells by the total number of mononuclear cells isolated from the organ. The animal protocol was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux du CRCHUM (N07027PAs).

Transfer of MOG-reactive CD8⁺ T lymphocytes into naive animals

Spleen and inguinal lymph nodes were extracted on day 8 after immunization and passed through a 70 μ m cell strainer (BD Biosciences). The cell suspension was treated with erythrocyte lysing solution (0.83% ammonium chloride) and resuspended in RPMI 1640 supplemented with 10% FBS. Cells were cultured *in vitro* for 3 days without any stimulation or in presence of 20 μ g/ml MOG₃₅₋₅₅, recombinant mouse IL-2 (50 U/ml) and recombinant mouse IL-15 (1 ng/ml). Levels of IFN- γ production by CD8⁺ T lymphocytes was evaluated by flow cytometry to assess their activation. Cells were harvested and washed in Hank's Balanced Salt Solution (HBSS). CD8⁺ T lymphocytes were purified using magnetic cell sorting (MACS; Miltenyi Biotec, Auburn, California) according to the manufacturer's instructions. CD8⁺ T lymphocyte purity was >90% as assessed by flow

cytometry. Purified CD8⁺ T lymphocytes were injected i.p. into 12 naïve recipient mice (10 x 10⁶ cells/mouse). On day 0 and 2 after the transfer 500 ng pertussis toxin were administered i.p. Mice were then injected i.p. on day 1, 3, 5, 7 and 9 with either anti- α 4 integrin (75 μ g; clone R1-2, monoclonal; BD Biosciences) or isotype control antibody (75 μ g of IgG2b clone A95-1, BD Biosciences). On day 18 post-transfer, three mice of each group were perfused with PBS and their organs were recovered. CNS-immune cells were isolated by Percoll gradient centrifugation. The number of CD3⁺ CD4⁺ T lymphocytes and CD3⁺ CD8⁺ T lymphocytes in the CNS were determined by multiplying the percentage of lineage marker-positive cells by the total number of mononuclear cells isolated from the CNS.

Coronavirus-infected mice

Four to five week-old female C57BL/6 mice (Charles River) were infected intracerebrally (i.c.) by the A59 neurotropic, neuroinvasive and neurovirulent strain of mouse hepatitis virus (MHV) (Gruslin *et al.*, 2005). The highest non-lethal dose of 450 plaque forming units (PFU) was administered in a maximal volume of 50 μ L (Gruslin *et al.*, 2005). A group of mice was inoculated with sterile media (mock). At day 4 post-infection, mice were injected i.p. with anti- α 4 integrin (75 μ g; monoclonal; BD Biosciences) or isotype control antibody (75 μ g of rat IgG2b; BD Biosciences). On day 7, five mice of each group were perfused with PBS and immune cells from the CNS were isolated. CD3⁺ CD4⁺ and CD3⁺ CD8⁺ T lymphocyte numbers were determined following the same method as for EAE. Two independent experiments were performed, both with 5 mice per group. The animal protocol was approved by the Comité Institutionnel de Protection des Animaux de l'INRS-Institut Armand Frappier (CIPA #0412-05).

Immunostaining of human and mouse CNS material

Luxol Fast Blue (LFB) and H&E stainings were performed on human brain tissue specimens obtained from four MS patients (autopsy) and on mouse spinal cord specimens as previously described (Kebir *et al.*, 2009). Sections showing acute demyelinating lesions

and active perivascular mononuclear cell infiltration were selected (3 donors: 8-12 blocks per donor). Mean age was 49 ± 6 years and disease duration ranged from 3 to 23 years. The causes of death were pneumonia (1), urosepsis (1) and barbiturate intoxication (1). CNS material from EAE animals was collected following rapid intra-cardiac PBS perfusion and snap-frozen in liquid nitrogen. Human and murine tissues were cryosectioned (7 μ m thick), mounted on superfrost slides (Thermo Scientific), fixed in -20°C acetone for 10 min and hydrated in PBS. Endogenous biotin was blocked with the Avidin/Biotin blocking kit (Invitrogen) when required. Non-specific immunoglobulin binding was blocked with serum for 30 min. Sections were then incubated for 1 h with the primary antibody diluted in serum. Slides were washed 5 times for 3 min with PBS Tween 20 0.05% (v/v) after each incubation. This was followed by 1h incubation with the secondary antibody. All incubations were done at room temperature. Corresponding isotypes were used as controls for the immunostains. Sections were then mounted with Gelvatol containing TOPRO-3 (Invitrogen) for nuclear staining. Fluorescence acquisition was done on a Leica SP5 confocal microscope (Leica Microsystems). Imaging processing and analysis were performed with Leica LAS AF software.

Statistical analysis

Statistical analyses were performed using PRISM GraphpadTM software and data are presented as the mean \pm the standard error of the mean (SEM). One-way analysis of variance (ANOVA) was performed followed by Bonferroni multiple comparison post-hoc test for all experiments except for the migration across the BBB, which was done using 2-way ANOVA without post-hoc tests. Only *P* values < 0.05 were considered significant.

RESULTS

Effector memory CD8⁺ T lymphocytes are enriched in the cerebrospinal fluid of MS patients

CD8⁺ T lymphocytes have been reported to be a significant cellular constituent of active MS lesions (Babbe *et al.*, 2000; Hauser *et al.*, 1986; Saikali *et al.*, 2007a; Traugott *et al.*, 1983) and to be found in the CSF of MS patients (Jacobsen *et al.*, 2002). We thus elected to compare the phenotype of CD8⁺ T lymphocytes present in the CSF to those in the PB of MS patients. PBMCs and CSF cells of untreated RRMS patients were immunostained and analyzed by flow cytometry. We noted an enrichment of effector memory (EM) CCR7⁻ CD62L⁻ CD3⁺ CD8⁺ T lymphocytes in the CSF (Fig. 1A, lower middle panel), as compared to the PB of the same patients (Fig. 1A, upper middle panel). To establish whether these lymphocytes carry effector lytic molecule(s) typically ascribed to the CD8 EM phenotype, we evaluated their expression of granzyme B. We detected an increased number of granzyme B-expressing CD8⁺ T cells in the CSF (Fig. 1A, lower right panel) as compared to the PB collected from the same patients (Fig. 1A, upper right panel). We repeated the phenotypic analysis on cells obtained from 17 RRMS patients and confirmed the significant increase of CD62L⁻ CCR7⁻ granzyme B⁺ EM CD8⁺ T lymphocytes in the CSF, relative to the PB (Fig. 1B; $P < 0.001$). Collectively, these data demonstrate the presence, accumulation and enrichment of potentially lytic EM CD8⁺ T lymphocytes in the CSF of MS patients with active disease.

Human BBB-ECs favor the recruitment of EM CD8⁺ T lymphocytes into the CNS compartment

In order to gain access to the CSF and accumulate in the CNS compartment, PB CD8⁺ T lymphocytes need to cross microvascular structures, including BBB-ECs, astrocytic end-feet, pericytes and basement membranes. To establish whether the enrichment of EM CD8⁺ T lymphocytes observed in the CSF of relapsing MS patients reflects a preferential migration of PB EM subsets, or whether the EM phenotype is induced during the

transmigration process, we used a well-established *in vitro* model of the BBB consisting of primary cultures of human CNS microvascular ECs grown in the presence of astrocytic factors (Ifergan *et al.*, 2006; Kebir *et al.*, 2009). Upon reaching confluence in the Boyden chamber, ECs were stimulated with TNF and IFN- γ (both at 100 U/ml), two cytokines reported to partake in MS pathogenesis (Sospedra and Martin, 2005) and known to activate ECs (Biernacki *et al.*, 2004; Calabresi *et al.*, 2001). After several washes to remove residual cytokines, *ex vivo* CD8⁺ T lymphocytes isolated from the PB of healthy donors were allowed to migrate for 24 h across human activated BBB-ECs. Migrated and non-migrated CD8⁺ T lymphocytes were collected and their phenotype was analyzed by flow cytometry. CD8⁺ T lymphocytes recovered from the lower chamber (migrated cells) were consistently enriched in CCR7⁻ CD62L⁻ cells, as compared to *ex vivo* CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 2A, top panels and Supp Fig. 1). Consistent with these findings, we detected higher proportions of CD3⁺ CD8⁺ granzyme B⁺ T lymphocytes (Fig. 2A, middle panels, large box and Supp Fig. 1) and perforin⁺ cells (Fig. 2A, middle panels, small box and Supp Fig. 1) in the migrated population than in non-migrated and in *ex vivo* (PB) cells. We did not observe any difference in EC death whether ECs were cultured in the presence or absence of CD8⁺ cells (n = 4; Supp Fig. 2), ruling out the possibility that the migration was the result of a damaged endothelial monolayer caused by exposure to cytotoxic CD8⁺ T lymphocytes.

Activated CD8⁺ T lymphocytes are characterized by their production of IFN- γ (Kaech *et al.*, 2002). It is also well-established that IL-17 secreted by T lymphocytes can disrupt endothelial and epithelial barriers (Kebir *et al.*, 2007). In humans, these two pro-inflammatory cytokines are known to be expressed by memory rather than by naive CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes (Kebir *et al.*, 2009; Kebir *et al.*, 2007). Therefore, we analyzed the capacity of activated human BBB-ECs to promote the recruitment of cytokine-secreting CD8⁺ T lymphocytes. While the migrated cell population was significantly enriched in CD3⁺ CD8⁺ T lymphocytes expressing IFN- γ alone or both IFN- γ and IL-17 (Fig. 2A, lower panels, right plot and Supp Fig. 1), the percentage of IFN- γ - or IL-17-expressing cells recovered from the upper chamber (non-migrated cells) did not significantly differ from the one in *ex vivo* PB cells.

To rule out the possibility that the EM phenotype was induced on CD8⁺ T lymphocytes following their transmigration across the activated endothelium, CD8⁺ CD62L⁺ and CD8⁺ CD62L⁻ populations were sorted and allowed to migrate separately across BBB-ECs. Interestingly, we found that CD8⁺ CD62L⁻ cells migrated more avidly across activated BBB-ECs than CD8⁺ CD62L⁺ cells (Fig. 2B). Similar results were obtained using non-activated BBB-ECs (data not shown). Furthermore, only a very small percentage (<2%) of CD62L⁺-sorted CD8⁺ T lymphocytes lost the surface expression marker CD62L upon migration across BBB-ECs (Fig. 2C). This confirms that the enrichment of EM CD8⁺ T lymphocytes following *in vitro* migration of CD8⁺ T lymphocytes results from their preferential recruitment across BBB-ECs rather than induction of an effector phenotype from non-effector memory CD8 populations. Collectively our findings demonstrate that activated human BBB-ECs promote the recruitment of EM CD8⁺ T lymphocytes with an increased propensity to secrete granzyme B, perforin, IFN- γ and IL-17.

Recruitment of EM CD8⁺ T lymphocytes in the early phase of EAE

In order to validate our human *in vitro* findings, we evaluated the temporal profile of CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocyte recruitment to the CNS in experimental models of neuroinflammation. Overall, we found a predominance of CD4⁺ over CD8⁺ T lymphocytes within the CD3⁺ lymphocyte population in the CNS of MOG₃₅₋₅₅-induced EAE mice (Fig. 3A, upper panels). However, at the pre-clinical phase of EAE (day 8 post immunization, score < 1.0) most CD8⁺ T lymphocytes found in the CNS were CCR7⁻ CD62L⁻ (EM), while CD4⁺ T lymphocytes were CCR7⁺ CD62L⁺ (non-EM, Fig. 3A middle left and lower left panels, respectively). During the symptomatic phase of the disease the proportion of EM CD4⁺ T lymphocytes increased significantly (day 12, EAE score 1 - 2.5, Fig. 3A lower center panel) and by day 18 (EAE score \geq 2.5) was equivalent to that of EM CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 3A middle right and lower right panels). The production of cytokines and granzyme B by CD8⁺ T lymphocytes correlated with their EM phenotype. At day 8 post-immunization, 94.8% of all CD8⁺ T lymphocytes in the CNS expressed granzyme B

(Fig. 3B, upper left panel) and 40.5% were IFN- γ ⁺ (Fig. 3B, lower left panel). At day 12 and day 18, we observed a marked reduction in the proportion of granzyme B⁻ and of IFN- γ -expressing CD8⁺ T lymphocytes infiltrating the CNS of EAE mice (Fig. 3B middle and right panels). Throughout the course of the disease, IL-17-expressing CD8⁺ T lymphocytes represented a negligible population of CNS infiltrating cells. These *in vivo* data corroborate our *in vitro* observations in human, suggesting a preferential recruitment of EM CD8⁺ T lymphocytes to the CNS compartment, in the early stage of autoimmune CNS inflammation. Moreover, these results support the notion that in EAE, specific populations of CCR7⁻ CD62L⁻ EM CD8⁺ T lymphocytes access the CNS at least ten days prior to the recruitment or the development of a significant population of CCR7⁻ CD62L⁻ EM CD4⁺ T lymphocytes.

Presence of EM CD8⁺ T lymphocytes in MS and EAE lesions

To determine whether EM CD8⁺ T lymphocytes found in the CSF of MS patients were also present in brain tissue, we performed *in situ* immunostaining for CD8, granzyme B and IFN- γ on >20 distinct post-mortem specimens obtained from 3 MS subjects. Since EM populations are defined by the absence or low expression of CD62L and CCR7, these markers could not be used for immunostainings. We focused the histological examination (Luxol Fast Blue and haematoxylin-eosin staining) on lesions characterized by perivascular infiltration within areas of demyelination, as previously shown (Cayrol *et al.*, 2008; Ifergan *et al.*, 2008; Kebir *et al.*, 2009; Kebir *et al.*, 2007). The infiltration of CD8⁺ T cells was relatively limited in these lesions and most of CD8⁺ T cells were scattered through the parenchyma or found in leptomeninges, as previously shown (Hayashi *et al.*, 1988; Saikali *et al.*, 2007a). Triple immunofluorescent staining demonstrated co-expression of IFN- γ and granzyme B in CD8⁺ T lymphocytes within white matter infiltrates (Fig. 4A) and in leptomeninges, with at least 20 ± 3 cells per lesion analyzed. Overall, we found that the CD4 to CD8 ratio within the perivascular area of human active MS lesions was of 8 CD4⁺ T lymphocytes for 1 CD8⁺ T lymphocyte (n= 12 lesions, from 3 donors).

We next sought to confirm these findings in MOG-immunized C57BL/6 EAE animals. Histological examination of frozen spinal cord sections obtained from 4 EAE mice showed that $41.8 \pm 7.8\%$ infiltrating CD8⁺ T lymphocytes were positive for IFN- γ (Fig. 4B, upper panels; Fig. 4C, left panel) and $78.1 \pm 13.4\%$ were positive for granzyme B (Fig. 4B, lower panels; Fig. 4C, right panel). These data support the notion that EM CD8⁺ T lymphocytes found in MS and EAE lesions carry a cytolytic potential.

The migration of CD8⁺ T lymphocytes to the CNS compartment is mediated by $\alpha 4$ integrin

We next studied the mechanism of CD8⁺ T lymphocyte recruitment to the CNS compartment, using the *in vitro* model of the BBB and blocking antibodies directed against several adhesion molecules, chemokines and integrins known to be involved in the leukocyte transmigration process. We found that specific blockade of ICAM-1, VCAM-1, ALCAM, PECAM-1, MHC-I, IL-8, MCP-1 and integrin αL did not alter the migration of human CD8⁺ T lymphocytes across resting (data not shown) or across TNF and IFN- γ -activated BBB-ECs (Fig. 5A). However, specific blockade of integrin $\alpha 4$ using the 2B4 monoclonal antibody (mAb) significantly reduced the migration of CD8⁺ T lymphocytes, when compared to appropriately-matched isotype control mAb (Fig. 5A; $P < 0.001$). This suggests that the migration of human CD8⁺ T lymphocytes across human BBB-ECs is dependent on $\alpha 4$ integrin, but independent of ICAM-1/LFA-1, ALCAM/CD6, PECAM-1/PECAM-1 interactions.

To confirm the role of integrin $\alpha 4$ in the migration of CD8⁺ T lymphocytes across BBB-ECs, we evaluated the effect of anti- $\alpha 4$ blockade on CD8⁺ T lymphocyte recruitment to the CNS during EAE. Using the MOG₃₅₋₅₅-induced C57BL/6 EAE model, we tested the ability of anti- $\alpha 4$ integrin antibody (75 μ g per injection i.p. on day 6, 9, 12, 15 and 18 post immunization) to impact on the recruitment of CD8⁺ T lymphocytes into CNS compartment. As previously demonstrated (Theien *et al.*, 2001), anti- $\alpha 4$ integrin treatment had a significant impact on the development of clinical signs of EAE (Fig. 5B) and on infiltration of immune cells into the CNS compartment (Fig. 5C – 5D). At the

histopathological level, total counts of CNS-infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes isolated at day 8, 12 and 18 revealed a predominance of CD4⁺ over CD8⁺ T cells (Fig. 5C and Fig. 5D, upper panels). However, and in accordance with our *in vitro* human data, we detected significantly lower numbers of CD3⁺ CD4⁺ and of CD3⁺ CD8⁺ T lymphocytes in the CNS compartment of EAE mice treated with anti- α 4 integrin Ab, as compared to those treated with the isotype mAb (Fig. 5C and Fig. 5D). To demonstrate a direct effect of anti- α 4 integrin Ab on the recruitment of CD8⁺ T lymphocytes, we first evaluated CD49d expression by infiltrating CD3⁺ CD8⁺ cells found in the CNS compartment of EAE mice 18 days post-immunization. We found that 96.8% of CNS-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes seen in isotype-treated mice expressed CD49d (Supp Fig. 3A, left panel). We also showed that there are no difference in the number of CD3⁺ CD8⁺ T lymphocytes found in the spleen of isotype-treated mice and anti- α 4 integrin-treated mice at day 8, 12 and 18 (Supp Fig. 3B, left panel), demonstrating that the antibody treatment does not deplete CD8⁺ T lymphocytes in the periphery.

Finally, in order to demonstrate that α 4 integrin blockade does not affect CD8⁺ T lymphocytes migration through CD4⁺ lymphocyte migration blockade, MOG-reactive CD8⁺ T lymphocytes were transferred into naive recipient mice, in the presence or absence of the anti- α 4 integrin Ab. CD3⁺ CD8⁺ lymphocytes were purified and restimulated *in vitro* in the presence of MOG₃₅₋₅₅, IL-2 and IL-15 before transfer (Supp Fig. 4A and 4B). While isotype control treated animals developed a mild disease (average score of 0.70 ± 0.26 , data not shown), anti- α 4 treated animals did not develop clinical signs of EAE (scores 0.1 ± 0.1). Furthermore, there was significantly less infiltration of both CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes into the CNS compartment of mice treated with the anti- α 4 integrin Ab, as compared to those treated with the isotype mAb at day 18 post-transfer (Fig. 5E; $P < 0.01$). The number of CD4⁺ T lymphocytes found in the CNS compartment were similar between the active immunization ($46\,500 \pm 5\,500$) and the CD8 adoptive transfer groups ($44\,860 \pm 11\,320$), suggesting that activated MOG-reactive CD8⁺ lymphocytes from the donor animal can attract by-stander naive CD4⁺ lymphocytes of the recipient animal into the CNS. Analysis of the CD8⁺ T lymphocyte population found in the CNS of recipient mice

revealed a large portion of EM cells (62.1%; Supp Fig. 4C, central panel) carrying the lytic enzyme Granzyme B and the inflammatory cytokine IFN- γ (68.2% and 63.3% respectively; Supp Fig. 4C, right panel). These results put forward the important contribution of $\alpha 4$ integrin in the recruitment of CD8⁺ T lymphocytes into the inflamed CNS compartment and suggest that encephalitogenic CD8⁺ T lymphocytes can attract naive by-stander CD4⁺ T lymphocytes into the CNS.

$\alpha 4$ integrin blockade affects the recruitment of CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes into the CNS compartment of coronavirus-infected mouse

One of the essential roles of CD8⁺ T lymphocytes is to protect the host against viral infections. To evaluate whether anti- $\alpha 4$ integrin blocking Ab could impact on the ability of CD8⁺ T lymphocytes to perform anti-viral surveillance of the CNS, we used a mouse model of CNS infection in which the MHV-A59 coronavirus is injected directly into the brain. CNS infection with MHV-A59 induces the migration into the brain of CD8⁺ T lymphocytes expressing VLA-4 and low levels of CD62L (Bergmann *et al.*, 2006; Stohlman *et al.*, 1998). The peak of CNS immune cell infiltration is observed 7 days after infection, coinciding with the clearance of infectious virus (Gruslin *et al.*, 2005; Hosking and Lane, 2009). As anticipated and as compared to uninfected animals, CD8⁺ T lymphocytes were the predominant subset found in the CNS of MHV-A59-infected mice (97.8×10^3 CD8⁺ T cells vs. 38.6×10^3 CD4⁺ T cells per brain; ratio of 3 CD8⁺ T lymphocytes for 1 CD4⁺ lymphocyte; Fig. 6A and 6D). Most infiltrating CD8⁺ T lymphocytes in the brain of MHV-A59-infected mice had an EM phenotype and expressed granzyme B (Fig. 6B - C). Granzyme B expression was higher in infiltrating CD8⁺ T lymphocytes than in CD4⁺ T lymphocytes, while the expression of IFN- γ was comparable between the two T lymphocyte subsets (Fig. 6C). To evaluate the role of $\alpha 4$ integrin in immune surveillance and defense against CNS viral infection, anti- $\alpha 4$ integrin Ab or IgG2b isotype were injected *i.p.* at day 4 after infection and animals were sacrificed at day 7. Anti- $\alpha 4$ integrin Ab-treated mice had a worse clinical phenotype (moribund), as compared to animals which received isotype control Ab. The importance of immune cell response for the clearance and

survival of mice following an MHV infection has been shown in several studies using RAG1^{-/-} and SCID mice (Houtman and Fleming, 1996; Wang *et al.*, 1990; Wu and Perlman, 1999). We observed a significant reduction in CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocyte infiltration in the CNS of mice treated with anti- α 4 integrin compared to control animals (Fig. 6D, $P < 0.05$ and 0.01 respectively). Again, to demonstrate the direct effect of anti- α 4 integrin Ab on CD8⁺ T lymphocytes recruitment to the CNS, we evaluated CD49d expression on CD3⁺ CD8⁺ cells found in the CNS of MHV-A59-infected mice 7 days after infection: 95.2% of infiltrating CD8⁺ T lymphocytes found in isotype-treated mice expressed CD49d (Supp Fig. 3A, right panel). We also showed that there were no difference in the number of CD3⁺ CD8⁺ cells found in the spleen of isotype-treated mice and anti- α 4 integrin-treated mice 7 days post-infection (Supp Fig. 3B, right panel), demonstrating that the antibody treatment does not deplete CD8⁺ T lymphocytes in the periphery. These data confirm the critical role of α 4 integrin in the recruitment of both T lymphocyte subsets during viral infection of the CNS compartment.

DISCUSSION

The goal of the current study was to characterize the phenotype of CD8⁺ T lymphocytes found in the CNS during autoimmune and virus-induced neuroinflammatory events, and to identify the molecular determinants involved in the trafficking of CD8⁺ T lymphocytes to the CNS compartment, whether the CSF, the brain parenchyma or the perivascular space. We demonstrate herein a preferential migration of CCR7⁻ CD62L⁻ EM CD8⁺ T lymphocytes to the CNS compartment, early in the course of EAE and MHV-A59 coronavirus infection. Our human data, using *ex vivo* CSF and PB samples of MS patients and *in situ* immunostainings of MS lesions demonstrate that the majority of CD8⁺ T lymphocytes found in the CNS compartment of MS patients (CSF and parenchyma) are CCR7⁻ CD62L⁻ EM CD8⁺ T lymphocytes. In addition, the data obtained from our *in vitro* model of the BBB, composed of primary cultures of human endothelial cells and astrocyte-conditioned media, show that CCR7⁻ CD62L⁻ EM CD8⁺ T lymphocytes are better suited to migrate through BBB-ECs. However, in order to gain access to the brain parenchyma, cells must migrate through a second layer of cells, the glia limitans which is not represented in our model (Bechmann *et al.*, 2007). A two steps model has been proposed, but accessibility of primary cells of pericytes, microglia and astrocytes is a challenge. While our *in vitro* human BBB assay does not recapitulate the entire complexity of the neurovascular unit (including pericytes and the parenchymal basement membrane), the data presented herein provides strong evidence that EM CD8⁺ T lymphocytes have a better propensity to migrate through BBB-ECs and vascular basement membrane than other CD8⁺ T cell subsets.

While the purpose of this study was not to prove the encephalitogenic potential of EM CD8⁺ T lymphocytes, we provide evidence that the majority of CNS-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes express granzyme B, perforin and IFN- γ . Moreover, we show that the migration of EM CD8⁺ T lymphocytes into the CNS precedes that of EM CD4⁺ T lymphocytes in EAE induced by active immunization and that the transfer of MOG-reactive CD8⁺ T lymphocytes into naive animals promotes the recruitment of by-stander CD4⁺ T lymphocytes of the recipient animal into its' own CNS. Finally, we demonstrate that MOG-reactive CD8⁺ T lymphocytes can induce a clinical form of mild EAE (average score of

0.70 ± 0.26), despite the recruitment of an equivalent number of CD4⁺ T lymphocytes. Our study therefore emphasizes the potential encephalitogenic activity of these CNS-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes, as previously proposed (Friese and Fugger, 2009; Saikali *et al.*, 2007a), but does not provide the evidence that CD8⁺ T lymphocytes can induce EAE, in the absence of MOG-reactive CD4⁺ T lymphocytes.

Using three distinct animal models of neuroinflammation and a human *in vitro* transmigration assay, we also clearly demonstrate that blocking α 4 integrin leads to a significant reduction in the migration of CD8⁺ T lymphocytes across CNS vascular structures. Surprisingly, CD8⁺ T lymphocyte migration was not affected by blocking interactions between α L integrin–ICAM-1, ALCAM–CD6, PECAM-1–PECAM-1 or CCL2/MCP-1–CCR2. Since each of these molecules were previously shown to partake in the recruitment of various subsets of leukocytes to the CNS, including CD4⁺ T lymphocytes (α L integrin, ALCAM, CCR2) (Cayrol *et al.*, 2008; Greenwood *et al.*, 1995; Prat *et al.*, 2002), monocytes/dendritic cells (α L integrin, ALCAM, CCR2) (Cayrol *et al.*, 2008; Seguin *et al.*, 2003), CD19⁺ B lymphocytes (α L integrin, ALCAM, CCR2) (Alter *et al.*, 2003; Cayrol *et al.*, 2008), eosinophils (α L integrin) (Gonlugur and Efeoglu, 2004), neutrophils (α L integrin, PECAM-1) (Choi *et al.*, 2009), and that none of them affect CD8⁺ T lymphocytes transmigration, we conclude that CD8⁺ T lymphocytes use different and more restricted molecular mechanisms to gain access to the CNS. It remains to be established whether, aside from α 4 integrin, additional and possibly still unidentified adhesion molecule or chemokine pathways are involved in the trafficking of CD8⁺ lymphocytes to the CNS. Nevertheless, our results point to an important and significant effect of α 4 integrin in the trans-endothelial recruitment of CD8⁺ T lymphocytes to the CNS in mice and in human, using an experimental *in vitro* BBB system. Our data also suggest that the considerable redundancy in molecular routes of migration observed for numerous leukocyte subsets (i.e for CD4⁺ T lymphocytes and monocytes) might not apply to CD8⁺ T lymphocytes, and that the recruitment of these cells into target organs might depend on a more restricted array of adhesion molecules.

Natalizumab is a humanized monoclonal antibody directed against $\alpha 4$ integrin (Engelhardt and Kappos, 2008). $\alpha 4$ integrin either associates with $\beta 1$ integrin to form VLA-4 or with $\beta 7$ integrin to form LPAM-1. Both heterodimers are expressed by lymphocytes in human and mouse, and are reported to be key mediators for the firm adhesion and migration of PB lymphocytes and APCs to CNS vascular structures, through interaction with VCAM-1 and/or the CS-1 specialized domain of matrix protein fibronectin (Berlin *et al.*, 1995; Luster *et al.*, 2005; von Andrian and Engelhardt, 2003). In EAE, injection of mice with anti- $\alpha 4$ integrin before the onset of symptoms prevents the development of the disease (Theien *et al.*, 2001; Yednock *et al.*, 1992). In MS patients, Natalizumab treatment decreases the number of lymphocytes in the CSF and has shown beneficial effects on relapses, disability, T2 lesions and gadolinium-positive lesions (Miller *et al.*, 2003; O'Connor *et al.*, 2004; Stuve *et al.*, 2006a; Tubridy *et al.*, 1999). Unfortunately, anti- $\alpha 4$ integrin therapy has been linked to an increase in the emergence of progressive multifocal leukoencephalopathy (PML), a devastating demyelinating disease of the CNS caused by reactivation of the human JC polyomavirus (Kleinschmidt-DeMasters and Tyler, 2005; Langer-Gould *et al.*, 2005; Van *et al.*, 2005), and previously known to occur mainly in patients with HIV/AIDS, haematological malignancies or post-transplantation immunosuppression (Berger, 2000). The cellular immune response mediated by antigen-specific EM CD8⁺ T lymphocytes against JC virus was shown to be crucial in the control of PML (Du Pasquier *et al.*, 2003; Du Pasquier *et al.*, 2004; Koralnik *et al.*, 2002; Marzocchetti *et al.*, 2009). Although speculative, it is tempting to suggest that the effects of anti- $\alpha 4$ integrin therapy on EM CD8⁺ T lymphocyte trafficking to the CNS, as observed in our study, could explain the emergence of PML in patients treated with Natalizumab. Given that the primary function of EM CD8⁺ T lymphocytes is to defend the organism against acute and persistent or latent viral infections, our data now provide evidence that immune surveillance of the CNS compartment by CD8⁺ T lymphocytes is significantly hampered by anti- $\alpha 4$ integrin therapy.

Overall, our data demonstrate that EM CD8⁺ T lymphocytes essentially depend on $\alpha 4$ integrin to migrate to the CNS. Given that this specific subset of CD8⁺ lymphocytes is

known to be involved in immune surveillance of target organs and to control acute or persistent infections, we postulate that the emergence of PML in Natalizumab-treated patients arises from a deficit in CD8-mediated immunosurveillance of the CNS compartment. Immune cell transmigration across BBB-ECs represents a critical step for initiation of CNS-directed immune reactions. Therefore, a better understanding of the mechanisms involved in the transmigration of specific leukocyte subsets is critically needed to develop therapies aiming to reduce organ-targeted inflammation, without affecting CD8-mediated immune surveillance.

ACKNOWLEDGMENTS

We would like to acknowledge the important contribution of the patients who have donated blood, cerebrospinal fluid and autopsy material to our MS specimen bank. We also would like to acknowledge the contribution of Dr. Jack P. Antel for providing us with human primary cultures of astrocytes. Additionally, we would like to thank Simone Terouz for her help in the preparation of MS tissue.

This study was supported by operating grants from the Multiple Sclerosis Society of Canada (MSSC) and the Canadian Institutes of Health Research (CIHR; MOP 89885 and MOP 14828) to AP. Operating grant MT-9203 from the Institute of Infection and Immunity of CIHR and a Tier-1 Canada Research Chair in Neuroimmunovirology to PJT are gratefully acknowledged, as well as a MSSC studentship to GM. AP and NA are Research Scholars of the Fonds de la Recherche en Santé du Québec and hold the Donald Paty career development award from the MSSC. II holds a studentship from the MSSC. HK holds a CIHR studentship, JIA holds a post-doctoral fellowship from the CIHR.

References

- Alter A, Duddy M, Hebert S, Biernacki K, Prat A, Antel JP, et al. Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *J Immunol.* 2003;170(9):4497-505.
- Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, 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. *JExpMed.* 2000;192(3):393-404.
- Becher B, Durell BG, Noelle RJ. IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *JClinInvest.* 2003;112(8):1186-91.
- Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 2007 Jan;28(1):5-11.
- Berger JR. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *CurrTreatOptionsNeurol.* 2000;2(4):361-8.
- Bergmann CC, Lane TE, Stohlman SA. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *NatRevMicrobiol.* 2006;4(2):121-32.
- Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell.* 1995;80(3):413-22.
- Biernacki K, Prat A, Blain M, Antel JP. Regulation of cellular and molecular trafficking across human brain endothelial cells by Th1- and Th2-polarized lymphocytes. *J NeuropatholExpNeurol.* 2004;63(3):223-32.
- Biernacki K, Prat A, Blain M, Antel JP. Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *J NeuropatholExpNeurol.* 2001;60(12):1127-36.

- Cabarrocas J, Bauer J, Piaggio E, Liblau R, Lassmann H. Effective and selective immune surveillance of the brain by MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *EurJImmunol.* 2003;33(5):1174-82.
- Calabresi PA, Prat A, Biernacki K, Rollins J, Antel JP. T lymphocytes conditioned with Interferon beta induce membrane and soluble VCAM on human brain endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 2001;115(1-2):161-7.
- Cayrol R, Haqqani AS, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Prat A. Isolation of human brain endothelial cells and characterization of lipid raft-associated proteins by mass spectroscopy. *Methods Mol Biol.* 2011;686:275-95.
- Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *NatImmunol.* 2008;9(2):137-45.
- Choi EY, Santoso S, Chavakis T. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. *Front Biosci.* 2009;14:1596-605.
- Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Schmitz JE, Zheng Y, Martin K, Peyerl FW, et al. Low frequency of cytotoxic T lymphocytes against the novel HLA-A*0201-restricted JC virus epitope VP1(p36) in patients with proven or possible progressive multifocal leukoencephalopathy. *JVirol.* 2003;77(22):11918-26.
- Du Pasquier RA, Schmitz JE, Jean-Jacques J, Zheng Y, Gordon J, Khalili K, et al. Detection of JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes in healthy individuals. *JVirol.* 2004;78(18):10206-10.
- Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sadovnick AD, Rice G, Anderson C, et al. A full genome search in multiple sclerosis. *NatGenet.* 1996;13(4):472-6.
- Engelhardt B, Kappos L. Natalizumab: targeting alpha4-integrins in multiple sclerosis. *NeurodegenerDis.* 2008;5(1):16-22.

- Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 2005;26(9):485-95.
- Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *AnnNeurol.* 2009;66(2):132-41.
- Friese MA, Fugger L. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain.* 2005;128(Pt 8):1747-63.
- Gonlugur U, Efeoglu T. Vascular adhesion and transendothelial migration of eosinophil leukocytes. *Cell Tissue Res.* 2004;318(3):473-82.
- Greenwood J, Wang Y, Calder VL. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *off. Immunology.* 1995;86(3):408-15.
- Gruslin E, Moisan S, St-Pierre Y, Desforges M, Talbot PJ. Transcriptome profile within the mouse central nervous system and activation of myelin-reactive T cells following murine coronavirus infection. *JNeuroimmunol.* 2005;162(1-2):60-70.
- Haines JL, Ter-Minassian M, Bazyk A, Gusella JF, Kim DJ, Terwedow H, et al. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *NatGenet.* 1996;13(4):469-71.
- Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *AnnNeurol.* 1986;19(6):578-87.
- Hayashi T, Morimoto C, Burks JS, Kerr C, Hauser SL. Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. *AnnNeurol.* 1988;24(4):523-31.

- Hosking MP, Lane TE. The Biology of Persistent Infection: Inflammation and Demyelination following Murine Coronavirus Infection of the Central Nervous System. *CurrImmunolRev.* 2009;5(4):267-76.
- Houtman JJ, Fleming JO. Dissociation of demyelination and viral clearance in congenitally immunodeficient mice infected with murine coronavirus JHM. *J Neurovirol.* 1996 Apr;2(2):101-10.
- Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *JExpMed.* 2001;194(5):669-76.
- Ifergan I, Kebir H, Bernard M, Wosik K, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, et al. The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain.* 2008;131(Pt 3):785-99.
- Ifergan I, Wosik K, Cayrol R, Kebir H, Auger C, Bernard M, et al. Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: relevance to multiple sclerosis. *AnnNeurol.* 2006;60(1):45-55.
- Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain : a journal of neurology.* 2002 Mar;125(Pt 3):538-50.
- Jiang H, Braunstein NS, Yu B, Winchester R, Chess L. CD8+ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+ T cells in EAE mice. *ProcNatlAcadSciUSA.* 2001;98(11):6301-6.
- Jiang H, Curran S, Ruiz-Vazquez E, Liang B, Winchester R, Chess L. Regulatory CD8+ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V beta repertoire during experimental autoimmune encephalomyelitis. *ProcNatlAcadSciUSA.* 2003;100(14):8378-83.

- Jiang H, Zhang SI, Pernis B. Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science*. 1992;256(5060):1213-5.
- Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *NatRevImmunol*. 2002;2(4):251-62.
- Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing T H 17 cells in multiple sclerosis. *AnnNeurol*. 2009;66(3):390-402.
- Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *NatMed*. 2007;13(10):1173-5.
- Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *NEnglJMed*. 2005;353(4):369-74.
- Koh DR, Fung-Leung WP, Ho A, Gray D, Cha-Orbea H, Mak TW. Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. *Science*. 1992;256(5060):1210-3.
- Koralnik IJ, Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Schmitz JE, Dang X, Zheng Y, et al. Association of prolonged survival in HLA-A2⁺ progressive multifocal leukoencephalopathy patients with a CTL response specific for a commonly recognized JC virus epitope. *JImmunol*. 2002;168(1):499-504.
- Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *JExpMed*. 2008;205(7):1535-41.
- Kubes P, Ward PA. Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain Pathol*. 2000;10(1):127-35.

- Langer-Gould A, Atlas SW, Green AJ, Bollen AW, Pelletier D. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *NEnglJMed*. 2005;353(4):375-81.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J ExpMed*. 2005;201(2):233-40.
- Linker RA, Rott E, Hofstetter HH, Hanke T, Toyka KV, Gold R. EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses. *NeurobiolDis*. 2005;19(1-2):218-28.
- Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *NatImmunol*. 2005;6(12):1182-90.
- Mahad D, Callahan MK, Williams KA, Ubogu EE, Kivisakk P, Tucky B, et al. Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain*. 2006;129(Pt 1):212-23.
- Marzocchetti A, Tompkins T, Clifford DB, Gandhi RT, Kesari S, Berger JR, et al. Determinants of survival in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*. 2009;73(19):1551-8.
- McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *AnnNeurol*. 2001;50(1):121-7.
- McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *NatImmunol*. 2007;8(9):913-9.
- Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *NEnglJMed*. 2003;348(1):15-23.

- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 2002;25(6):313-9.
- O'Connor PW, Goodman A, Willmer-Hulme AJ, Libonati MA, Metz L, Murray RS, et al. Randomized multicenter trial of natalizumab in acute MS relapses: clinical and MRI effects. *Neurology.* 2004;62(11):2038-43.
- Oksenberg JR, Hauser SL. Genetics of multiple sclerosis. *NeurolClin.* 2005;23(1):61-75, vi.
- Prat A, Biernacki K, Lavoie JF, Poirier J, Duquette P, Antel JP. Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *ArchNeurol.* 2002;59(3):391-7.
- Prat A, Biernacki K, Pouly S, Nalbantoglu J, Couture R, Antel JP. Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2000;59(10):896-906.
- Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia.* 2001;36(2):145-55.
- Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *NatRevImmunol.* 2003;3(7):569-81.
- Saikali P, Antel JP, Newcombe J, Chen Z, Freedman M, Blain M, et al. NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *JNeurosci.* 2007;27(5):1220-8.
- Sawcer S, Jones HB, Feakes R, Gray J, Smaldon N, Chataway J, et al. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *NatGenet.* 1996;13(4):464-8.

- Saxena A, Bauer J, Scheikl T, Zappulla J, Audebert M, Desbois S, et al. Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J Immunol*. 2008;181(3):1617-21.
- Seguin R, Biernacki K, Rotondo RL, Prat A, Antel JP. Regulation and functional effects of monocyte migration across human brain-derived endothelial cells. *J NeuropatholExpNeurol*. 2003;62(4):412-9.
- Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *AnnuRevImmunol*. 2005;23:683-747.
- Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76(2):301-14.
- Stohlman SA, Bergmann CC, Lin MT, Cua DJ, Hinton DR. CTL effector function within the central nervous system requires CD4+ T cells. *J Immunol*. 1998;160(6):2896-904.
- Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *NatMed*. 2008;14(3):337-42.
- Stuve O, Marra CM, Jerome KR, Cook L, Cravens PD, Cepok S, et al. Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *AnnNeurol*. 2006;59(5):743-7.
- Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, et al. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol*. 2001;166(12):7579-87.
- Theien BE, Vanderlugt CL, Eagar TN, Nickerson-Nutter C, Nazareno R, Kuchroo VK, et al. Discordant effects of anti-VLA-4 treatment before and after onset of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*. 2001;107(8):995-1006.

- Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. *Science*. 1983;219(4582):308-10.
- Tubridy N, Behan PO, Capildeo R, Chaudhuri A, Forbes R, Hawkins CP, et al. The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group. *Neurology*. 1999;53(3):466-72.
- Van AG, Van RM, Sciot R, Dubois B, Vermeire S, Noman M, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *NEnglJMed*. 2005;353(4):362-8.
- von Andrian UH, Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *NEnglJMed*. 2003;348(1):68-72.
- Wang FI, Stohlman SA, Fleming JO. Demyelination induced by murine hepatitis virus JHM strain (MHV-4) is immunologically mediated. *J Neuroimmunol*. 1990 Nov;30(1):31-41.
- Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J NeuropatholExpNeurol*. 1999;58(2):138-52.
- Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, Berthelet F, Bernard M, Moundjian R, et al. Angiotensin II Controls Occludin Function and Is Required for Blood Brain Barrier Maintenance: Relevance to Multiple Sclerosis. *J Neurosci*. 2007;27(34):9032-42.
- Wu GF, Perlman S. Macrophage infiltration, but not apoptosis, is correlated with immune-mediated demyelination following murine infection with a neurotropic coronavirus. *J Virol*. 1999 Oct;73(10):8771-80.
- Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 1992;356(6364):63-6.

York NR, Mendoza JP, Ortega SB, Benagh A, Tyler AF, Firan M, et al. Immune regulatory CNS-reactive CD8+T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *JAutoimmun.* 2010;35(1):33-44.

Zehntner SP, Brisebois M, Tran E, Owens T, Fournier S. Constitutive expression of a costimulatory ligand on antigen-presenting cells in the nervous system drives demyelinating disease. *FASEB J.* 2003;17(13):1910-2.

Figure 1. The cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients contains predominantly effector memory CD8⁺ T lymphocytes. (A) Flow cytometry profile of peripheral blood and CSF of one representative relapsing-remitting MS patient reveals that CCR7⁻ CD62L⁻ effector memory CD8⁺ T lymphocytes are enriched in the CSF (lower middle panel) compared to the peripheral blood (upper middle panel). Also, CD8⁺ T lymphocytes in the CSF express higher levels of granzyme B (lower right panel) than CD8⁺ T lymphocytes isolated from the blood (upper right panel) of the same patient. Data shown are representative of 17 independent experiments using 17 distinct MS donors. (B) Percentage of effector memory and granzyme B-expressing CD8⁺ T lymphocytes in the CSF and in the blood of 17 relapsing-remitting MS patients. The CSF (white bars) showed significantly more effector memory and granzyme B⁺ CD8 T lymphocytes compared to the peripheral blood (black bars). Results are expressed as the mean \pm SEM of the 17 MS patients (***, $P < 0.001$).

Figure 1

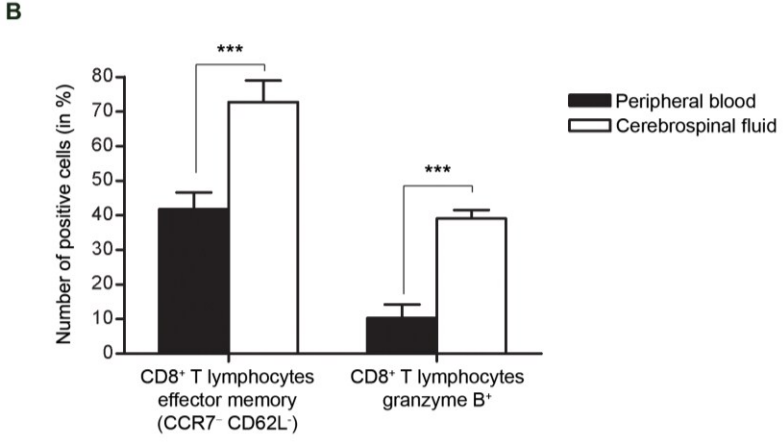
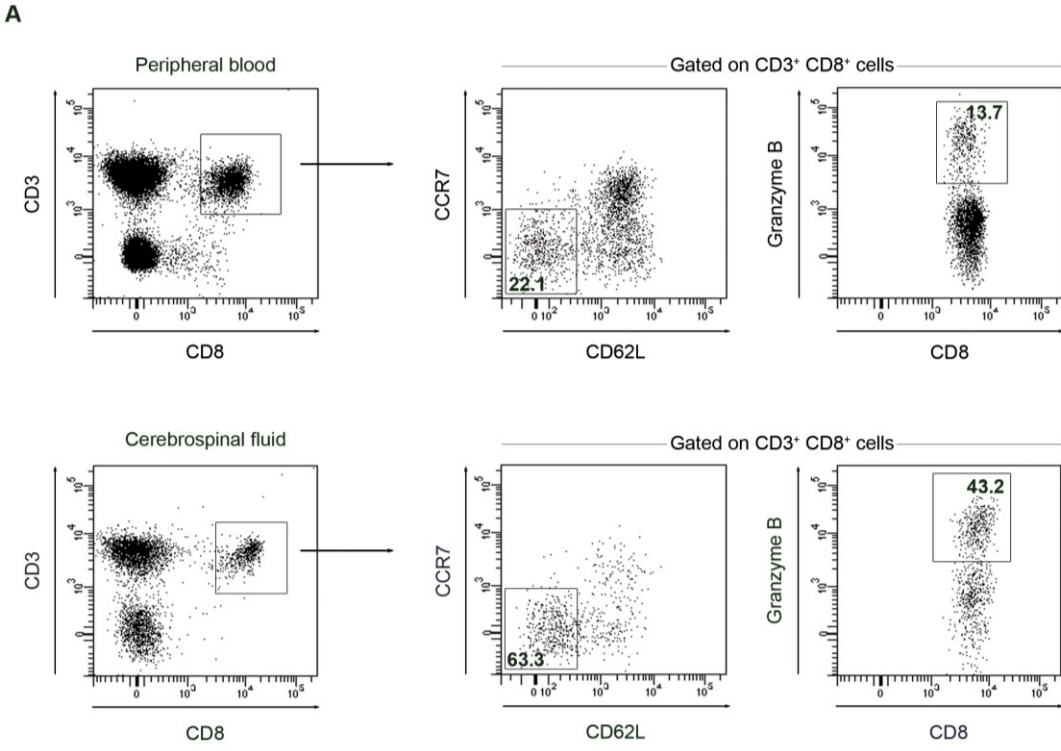


Figure 2. Increased migration of *ex vivo* effector memory CD8⁺ T lymphocytes across BBB-ECs. (A) Human *ex vivo* CD8⁺ T lymphocytes were allowed to migrate for 24 h across activated human BBB-ECs in a modified Boyden chamber and then analyzed by flow cytometry. The migrated population (upper right panel) contained an enriched effector memory phenotype (CCR7⁻ CD62L⁻) compared to the non-migrated (upper middle panel) and to the *ex vivo* (upper left panel) populations. Also, migrated cells were enriched in the cytolytic enzymes granzyme B (large boxes) and perforin (small boxes) (center right panel) compared to the non-migrated populations (center middle and left panels). Inflammatory cytokines IFN- γ and IL-17 were also detected at higher levels in migrated CD8⁺ T lymphocytes (lower right panel) compared to the non-migrated CD8⁺ T lymphocytes (lower middle panel) and to the CD8⁺ T lymphocytes before migration (lower left panel). Data shown are representative of 10 independent experiments using 10 distinct blood donors on 7 distinct BBB-EC preparations. (B) Human *ex vivo* CD8⁺ CD62L⁺ or CD8⁺ CD62L⁻ T lymphocytes were sorted and allowed to migrate for 24 h across inflamed human BBB-ECs. Sorted CD8⁺ CD62L⁻ T lymphocytes (black bar) had an enhanced migratory capacity when compared to CD8⁺ CD62L⁺ T lymphocytes (white bar). Results are expressed as mean \pm SEM of 3 independent experiments, performed in triplicate on 2 distinct BBB-EC preparations (**, $P < 0.01$). (C) CD8⁺ CD62L⁺ and CD8⁺ CD62L⁻ T lymphocytes were allowed to migrate for 24 h across inflamed human BBB-ECs, collected from the lower chamber and analyzed for CD62L expression by flow cytometry. Sorted CD8⁺ CD62L⁺ T lymphocytes (shaded histogram) did not lose CD62L expression after migration and CD8⁺ CD62L⁻ T lymphocytes (open histogram) did not acquire CD62L expression after migration. Data shown are representative of 3 independent experiments.

Figure 2:

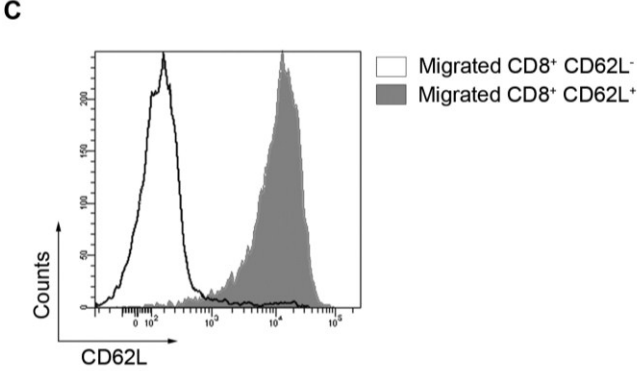
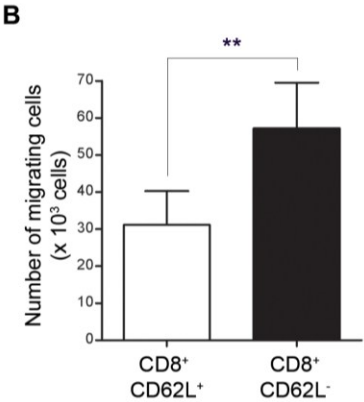
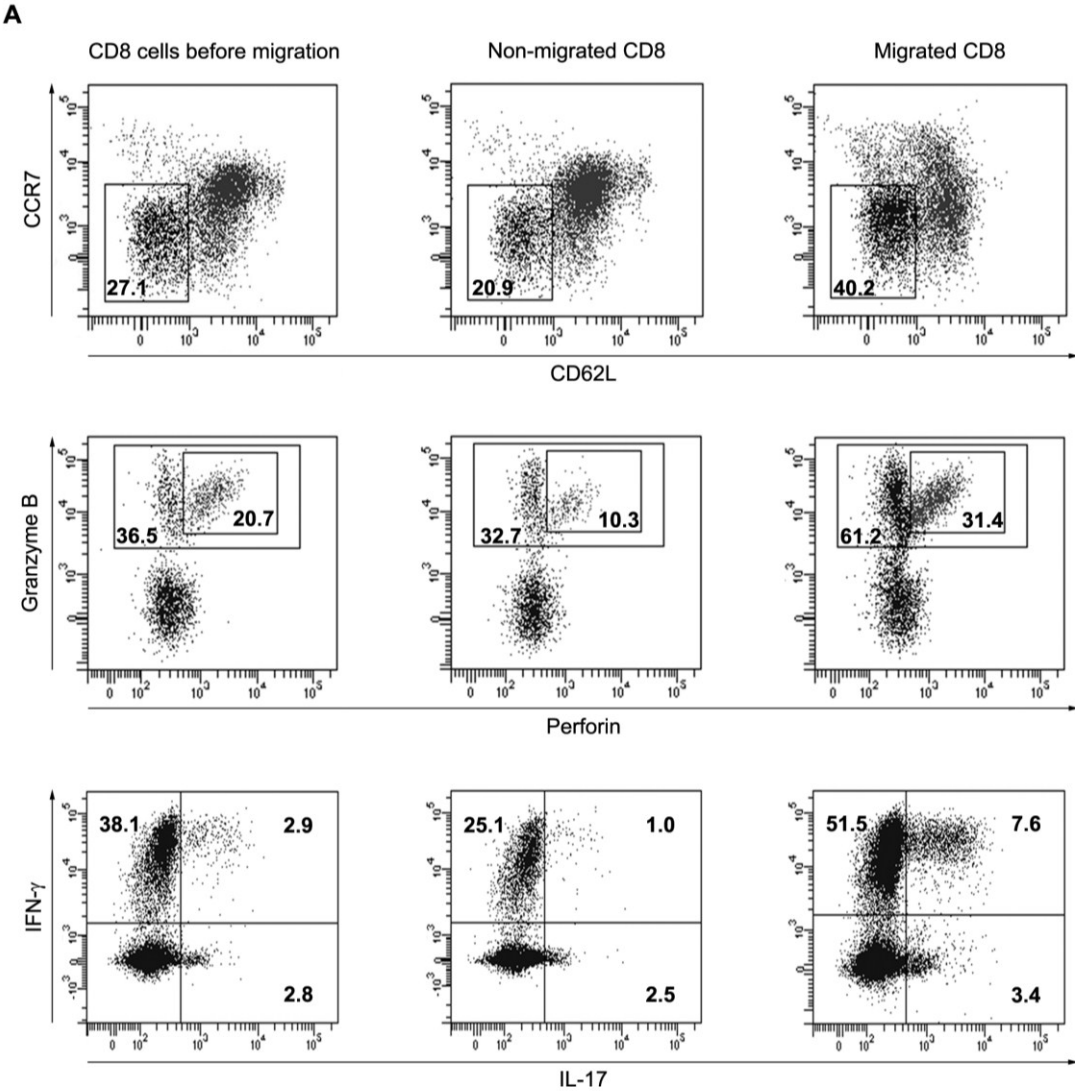
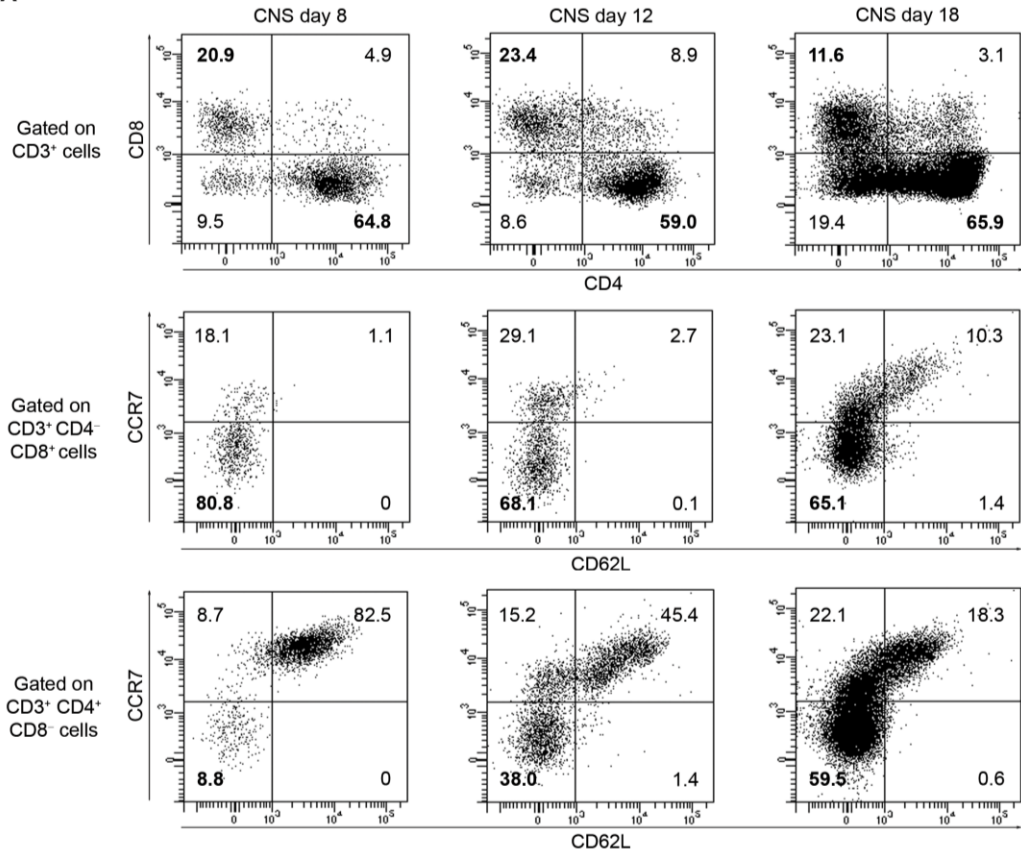


Figure 3. Effector memory CD8⁺ T lymphocytes accumulate in the CNS of EAE mice.

EAE was induced by active immunization of C57BL/6 animals with MOG₃₅₋₅₅/CFA. At day 8, 12 and 18 after induction of the disease, the brain and spinal cord were homogenized and immune cells were isolated by Percoll gradient centrifugation and analyzed by flow cytometry. **(A)** Cells were first gated on CD3 (upper panels), and expression of CCR7 and CD62L was assessed on CD3⁺ CD4⁻ CD8⁺ (middle panels) and CD3⁺ CD4⁺ CD8⁻ (lower panels) T lymphocytes. The frequency of effector memory CD8⁺ T lymphocytes decreased from 80.8% at day 8 (upper left panel) to 65.1% at day 18 (upper right panel), whereas the frequency of effector memory CD4⁺ T lymphocytes increased from 8.8% at day 8 (lower left panel) to 59.5% at day 18 (lower right panel). **(B)** Expression of granzyme B (upper panels), IFN- γ and IL-17 (lower panels) were assessed by flow cytometry on CD3⁺ CD8⁺ T lymphocytes found in CNS of EAE mice. The frequency of granzyme B⁺ cells decreased from 94.8% at day 8 (upper left panel) to 44.0% at day 18 (upper right panel). The percentage of CD8⁺ IFN- γ ⁺ cells decreased from 40.5% at day 8 (lower left panel) to 20.6% at day 18 (lower right panel) and that of CD8⁺ IL-17⁺ cells did not change (lower right panel). Data shown are representative of 2 independent EAE experiments performed on 3 to 4 mice per time-point.

Figure 3

A



B

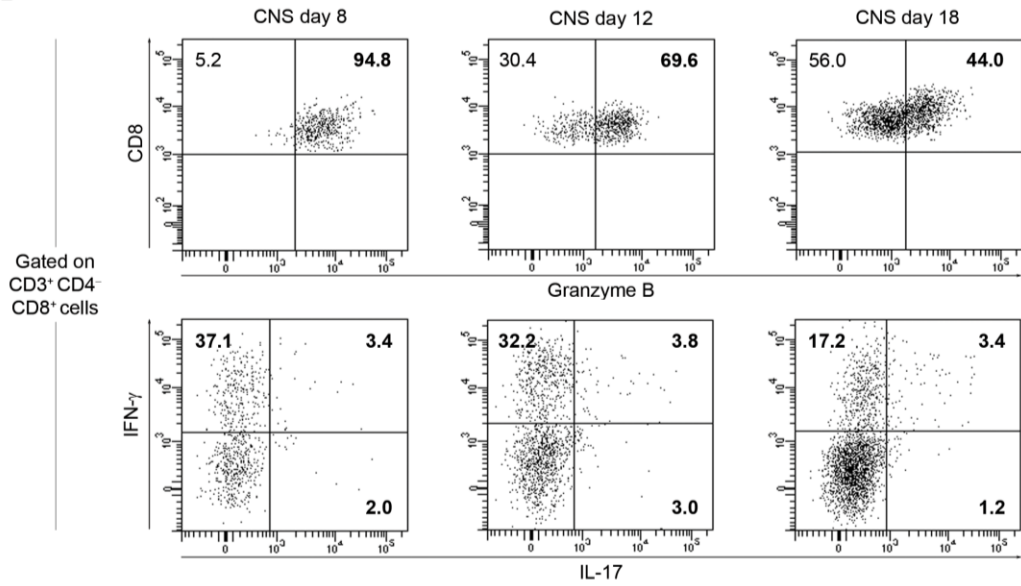
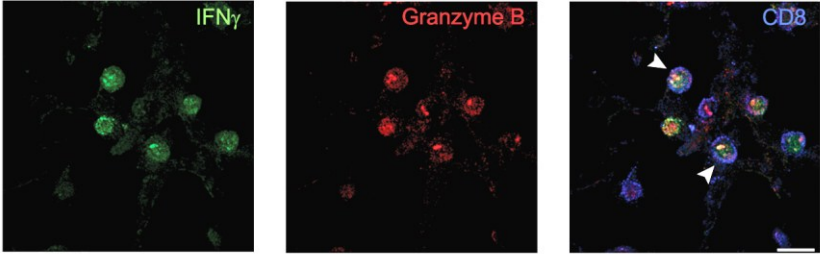


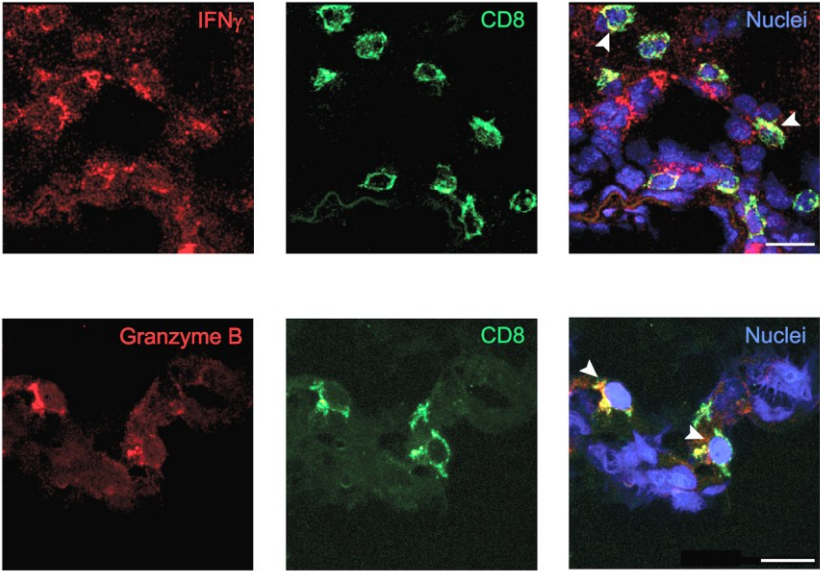
Figure 4. Granzyme B and IFN- γ are highly expressed by CD8⁺ T lymphocytes in MS and EAE tissue. (A) Frozen CNS specimens (7 μ m sections) from MS patients were immunostained for CD8 (in blue), granzyme B (in red) and IFN- γ (in green). Immunostainings were acquired by confocal microscopy. The majority of CD8⁺ T lymphocytes found in within MS brain specimen expressed granzyme B and IFN- γ (arrowheads). Photomicrographs shown are representative of immunostainings performed on 12 brain sections from frozen CNS material of 3 MS patients. Scale bar = 10 μ m. (B) Frozen CNS sections (7 μ m) from EAE mice 12 days post-induction were immunostained for CD8 (in green), TOPRO-3 for nuclear staining (in blue) and either IFN- γ (in red, upper panel) or granzyme B (in red, lower panel). Co-localization is presented in right panels, and CD8⁺ T lymphocytes expressing either IFN- γ or granzyme B are shown by arrowheads. Photomicrographs shown are representative of >20 immunostainings performed on post-mortem material (brain and spinal cord) from 4 animals. Scale bar represent 10 μ m. (C) Quantification of IFN- γ and granzyme B-expressing CD8⁺ T lymphocytes in the CNS of EAE animals revealed that the majority of CNS infiltrating CD8⁺ lymphocytes expressed granzyme B. IL-17-expressing CD8⁺ T lymphocytes could not be detected by microscopy. Data shown represent mean \pm SEM from n = 10 CNS sections from 4 animals (*, $P < 0.05$).

Figure 4

A



B



C

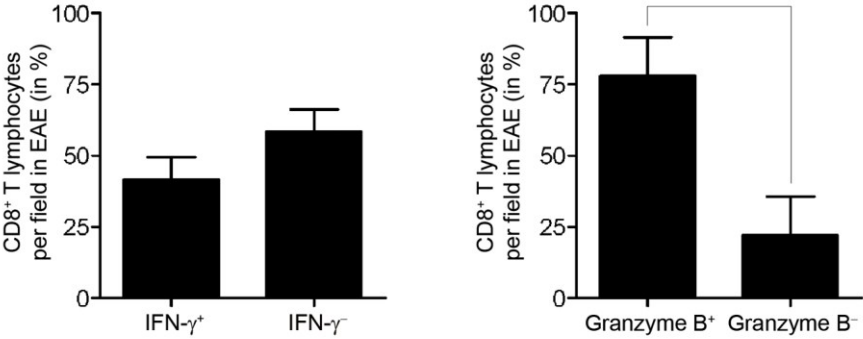


Figure 5. Migration of CD8⁺ T lymphocytes to the CNS depends on α 4 integrin. (A) Human *ex vivo* CD8⁺ T lymphocytes isolated from the blood of healthy donors were allowed to migrate across activated human BBB-ECs in a modified Boyden chamber for 24 h and then analyzed by flow cytometry. The migration of CD8⁺ T lymphocytes was significantly reduced by anti- α 4 integrin blockade (clone 2B4), but not by neutralization of ICAM-1, VCAM-1, ALCAM, PECAM-1, MHC-I, IL-8, MCP-1 or α L integrin (CD11a). Individual effect of treatment groups on CD8⁺ T lymphocyte migration was normalized to its' own isotype control, to allow comparison. Results are expressed as mean \pm SEM of 10 independent experiments, performed in triplicate on 7 distinct BBB-EC preparations. ***, $P < 0.001$, treatment group compared to its corresponding isotype. (B) *In vivo* blockade of α 4 integrin improves EAE clinical scores. EAE was induced by active immunization of C57BL/6 animals with MOG₃₅₋₅₅/CFA. Anti- α 4 integrin (clone R1-2, open triangle) or isotype control antibody (IgG2b, filled circle) were injected intraperitoneally (i.p.) (75 μ g) at day 6, 9, 12, 15 and 18 post-immunization (arrow heads), Results are expressed as mean \pm SEM of at least 10 mice per group per day. Data shown are representative of 2 independent experiments performed on 22 mice per group (*, $P < 0.05$). (C) At day 8, 12 and 18 after induction of the EAE, the brain and spinal cord were homogenized and immune cells were isolated by Percoll gradient centrifugation. There were significantly less CD8⁺ (left bar graphs) and CD4⁺ T lymphocytes (right bar graphs) in the CNS of EAE mice treated with anti- α 4 integrin (grey bars) than in EAE mice treated with the control isotype IgG2b (black bars) at day 12 and day 18. Results are expressed as mean \pm SEM of 2 independent EAE experiments performed on 3 to 4 mice per time-point (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$). (D) Frozen CNS specimens (7 μ m sections) from EAE mice were stained for luxol fast blue-hematoxylin and eosin or immunostains for CD8 (in green), CD4 (in red) and TO-PRO-3 for nuclear staining (in blue). EAE brains from anti- α 4 integrin treated mice (lower panel) showed a reduction in immune cell infiltration, demyelination, and in number of infiltrating CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes, as compared to the isotype IgG2b control group (upper panel). Photomicrographs shown are representative of >20 stainings

performed on four animals. Dotted lines delineate areas of infiltration. *, depicts a vessel. Scale bar represents 10 μm . **(E)** *In vivo* blockade of $\alpha 4$ integrin in a CD8^+ T lymphocytes transfer model reduces CD4^+ and CD8^+ T lymphocytes infiltration to the CNS compartment. Ten millions of MOG-reactivated CD8^+ T lymphocytes were injected i.p. into recipient mice. Anti- $\alpha 4$ integrin or isotype control antibody (75 μg) was injected i.p, at day 1, 3, 5, 7 and 9 post-transfer. At day 18 after the transfer, the brain and spinal cord were homogenized and immune cells were isolated by Percoll gradient centrifugation. There was significantly less CD8^+ and CD4^+ T lymphocyte in the CNS of mice treated with anti- $\alpha 4$ integrin (grey bars) than in mice treated with the control isotype IgG2b (black bars). Results are expressed as mean \pm SEM of 3 mice (**, $P < 0.01$).

Figure 5

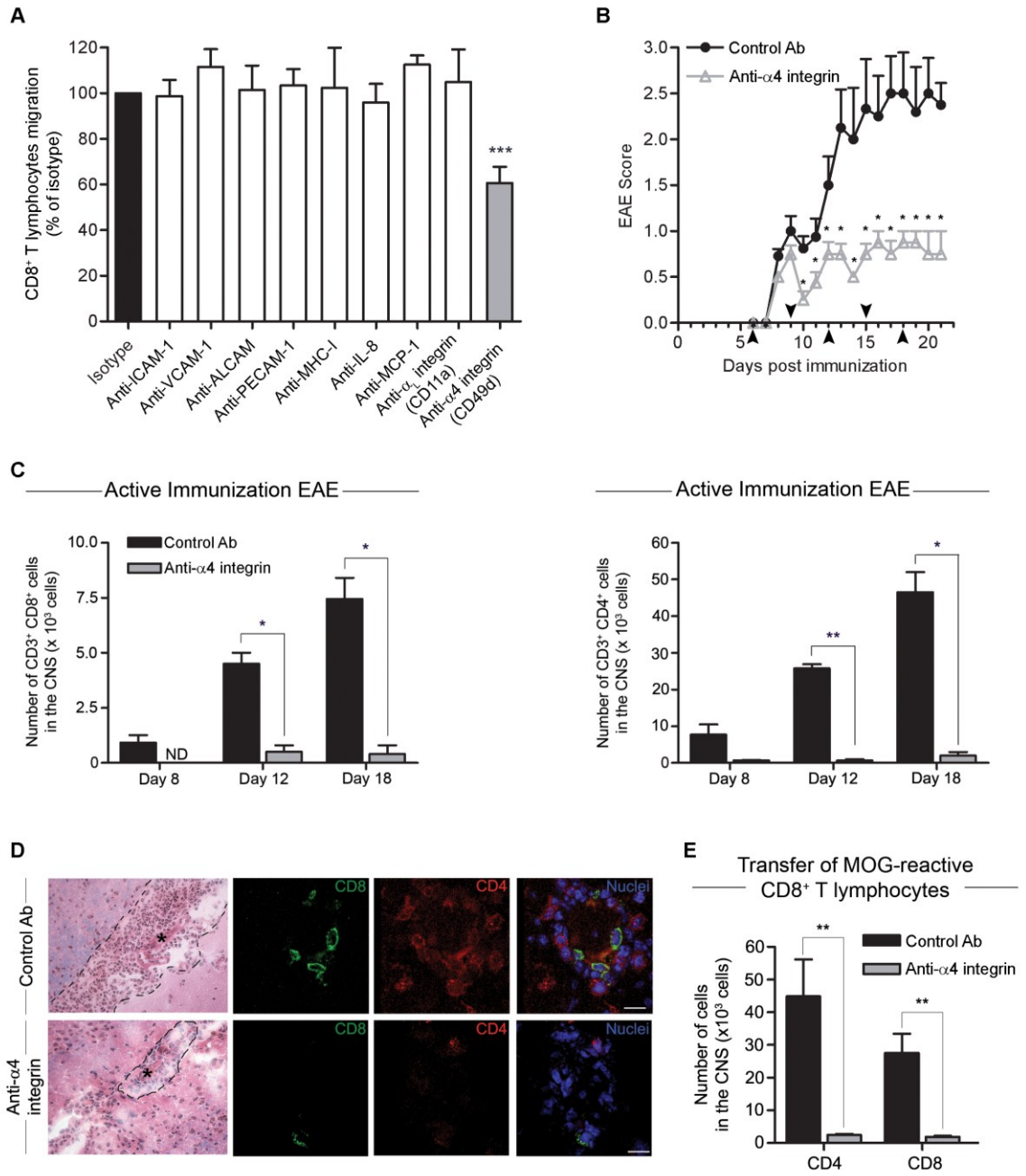
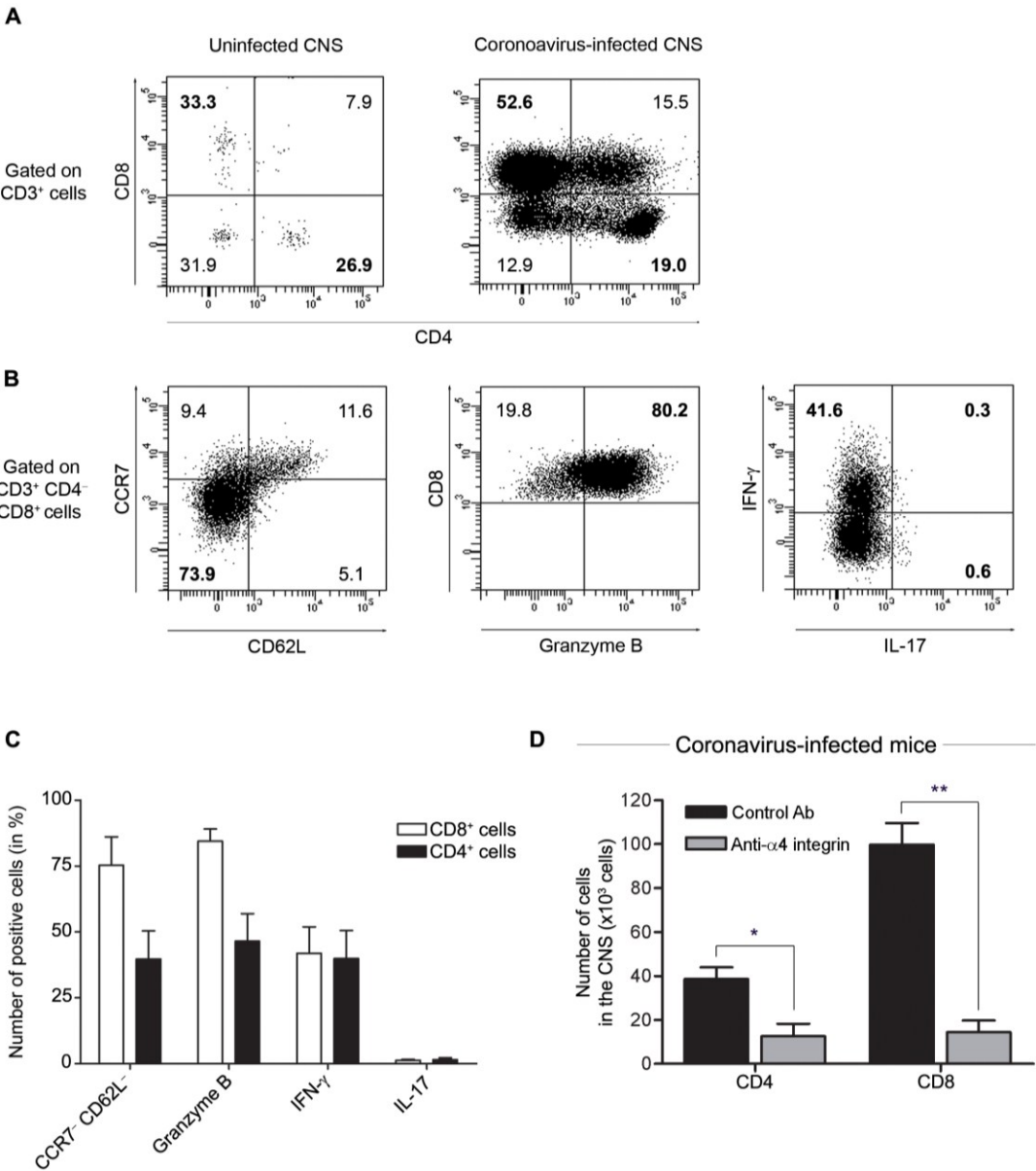


Figure 6. Anti- $\alpha 4$ integrin treatment restricts migration of CD8⁺ T lymphocytes to the CNS in MHV-A59-infected mice. Mice were infected intracerebrally with the A59 neurotropic, neuroinvasive and neurovirulent strain of MHV. On day 7, five mice were sacrificed and immune cells from the CNS were isolated by Percoll gradient centrifugation. **(A)** Characterization of CNS infiltration by CD3⁺ CD8⁺ and CD3⁺ CD4⁺ T lymphocytes in uninfected mice (left panel) and coronavirus-infected mice (right panel). **(B)** The profile of CD3⁺ CD8⁺ T lymphocytes was analyzed by flow cytometry in infected mice. The proportion of effector memory (CCR7⁻ CD62L⁻) CD8⁺ T lymphocytes was 73.9% (lower left panel). The proportion of CD8⁺ T lymphocytes expressing granzyme B (lower center panel) and IFN- γ (lower right panel) were 80.2% and 41.6%, respectively. Data shown are representative of 5 mice in 2 independent experiments. **(C)** Effector memory (CCR7⁻ CD62L⁻) phenotype, granzyme B, IFN- γ and IL-17 expression of CD3⁺ CD8⁺ (white bars) or CD3⁺ CD4⁺ T lymphocytes (black bars) collected from the brain of MHV-A59-infected mice. The majority of CD8⁺ T lymphocytes collected from the CNS had an effector memory phenotype and expressed granzyme B. In comparison, less than 50% of CD4⁺ T lymphocytes had an effector memory phenotype. Expression levels of IFN- γ and IL-17 remained similar for both cell types, and IL-17 expression remained barely detectable in the CNS of MHV-A59 infected animals. Results are expressed as mean \pm SEM, n = 10 mice. **(D)** Mice infected intracerebrally with MHV-A59 virus were injected intraperitoneally with anti- $\alpha 4$ integrin or isotype control IgG2b antibody (75 μ g) on day 4. On day 7, animals were sacrificed and immune cells from the CNS were isolated. A significant reduction in the number of both CD8⁺ and CD4⁺ T lymphocytes was found in the CNS of mice treated with anti- $\alpha 4$ integrin (grey bars) compared to control isotype injected animals (black bars). Results shown are expressed as mean \pm SEM of 5 animals, and representative of 2 consecutive experiments (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$).

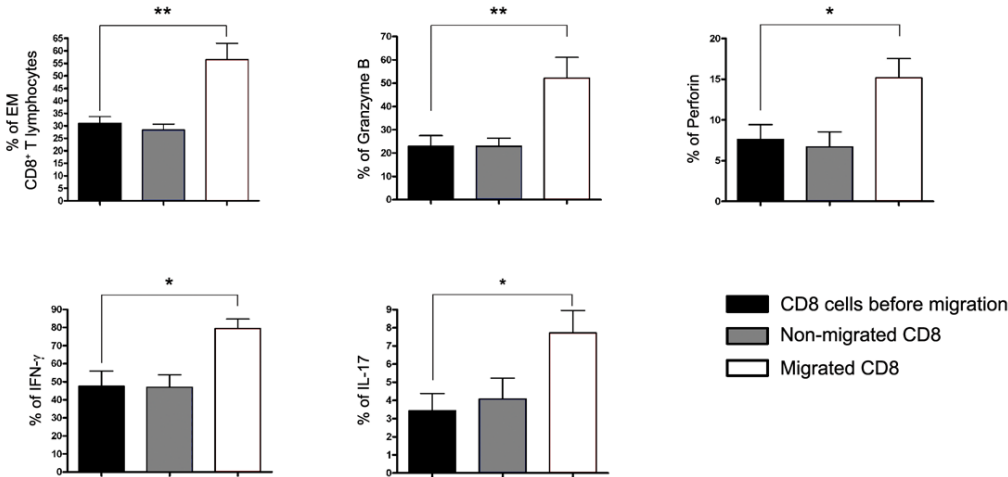
Figure 6



SUPPLEMENTARY FIGURES

Supplementary Figure 1. Upon migration, *ex vivo* CD8⁺ T lymphocytes display an effector memory phenotype. Flow cytometry profile of 10 healthy donors for CD8⁺ T lymphocytes before migration, CD8⁺ T lymphocytes that have not migrated and migrated CD8⁺ T lymphocytes. *Ex vivo* CD8⁺ T lymphocytes were migrated across activated BBB-ECs grown to confluency in Boyden chambers. There were significantly more CD8⁺ T lymphocytes with an effector memory (EM) phenotype (top left graph) in the migrated population (white bars) compared to the non-migrated population (grey bars) and to the population before migration (black bars). Granzyme B (top center graph) and perforin (top right graph) were significantly more present in the migrated CD8⁺ T lymphocytes compared to the other two populations. Also inflammatory cytokines IFN- γ (lower left graph) and IL-17 (lower center graph) were significantly higher in migrated CD8⁺ T lymphocytes compared to the non-migrated CD8⁺ T lymphocytes and to the CD8⁺ T lymphocytes before migration. Results are expressed as mean \pm SEM of the 10 healthy donors (*, $P < 0.05$ and **, $P < 0.01$).

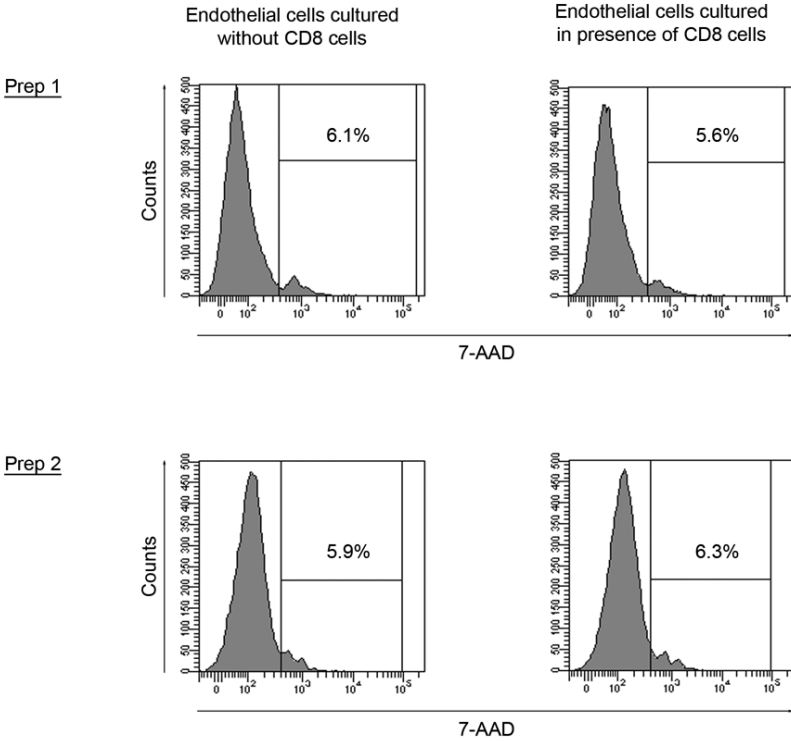
Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 2. CD8⁺ T lymphocytes are not inducing endothelial cell death.

Two different preparations of endothelial cells were cultured for 24 h in presence or absence of purified *ex vivo* allogeneic CD8⁺ T lymphocytes. Endothelial cell death was assessed by flow cytometry with a 7-AAD staining on CD8⁻ cells. No difference in cell death was observed whether endothelial cells were cultured with or without CD8⁺ T lymphocytes.

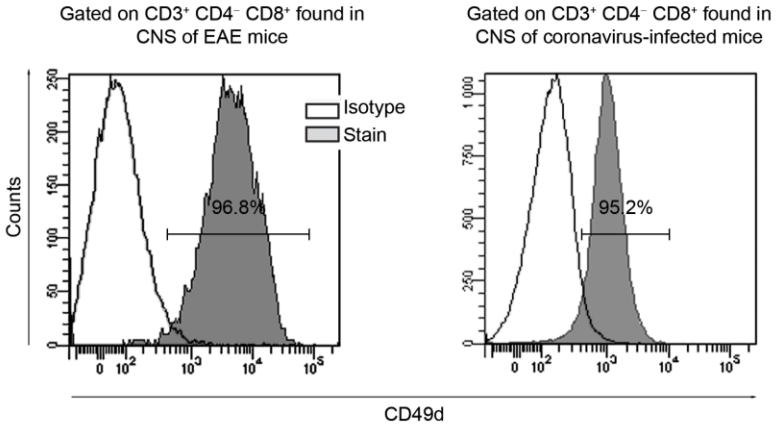
Supplementary Figure 2



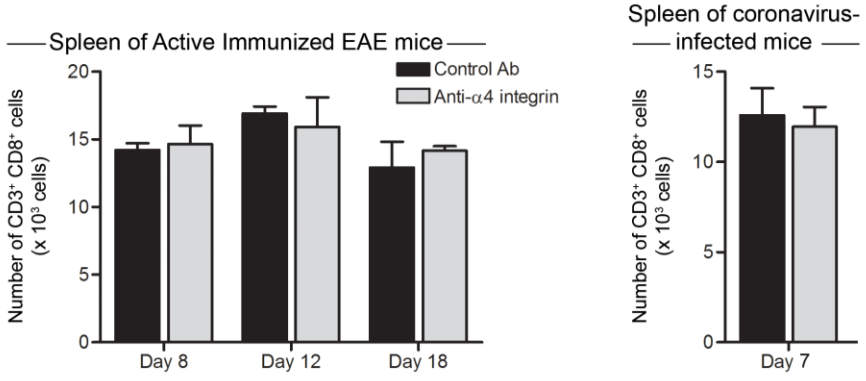
Supplementary Figure 3. CD49d expression by CD8⁺ T lymphocytes and numbers of CD8⁺ T lymphocytes found in the periphery of anti- α 4 integrin treated-animals. (A) CD49d expression on CD8⁺ T lymphocytes found in the CNS of EAE mice at day 18 (left panel) and coronavirus-infected mice at day 7 (right panel). In both animal models, CD8⁺ T lymphocytes are expressing high levels of CD49d (shaded histogram) as compared to the corresponding isotype (open histogram). **(B)** At day 8, 12 and 18 after induction of the EAE (left panel), and at day 7 after infection with MHV-A59 (right panel), the spleen was homogenized and immune cells were isolated. There were no difference in the number of CD8⁺ T lymphocytes found in the isotype control treated-mice (black bars), as compared to the anti- α 4 treated-mice (grey bars). Results are expressed as mean \pm SEM of 2 independent animal experiments performed on 3 to 4 mice per time-point.

Supplementary Figure 3

A

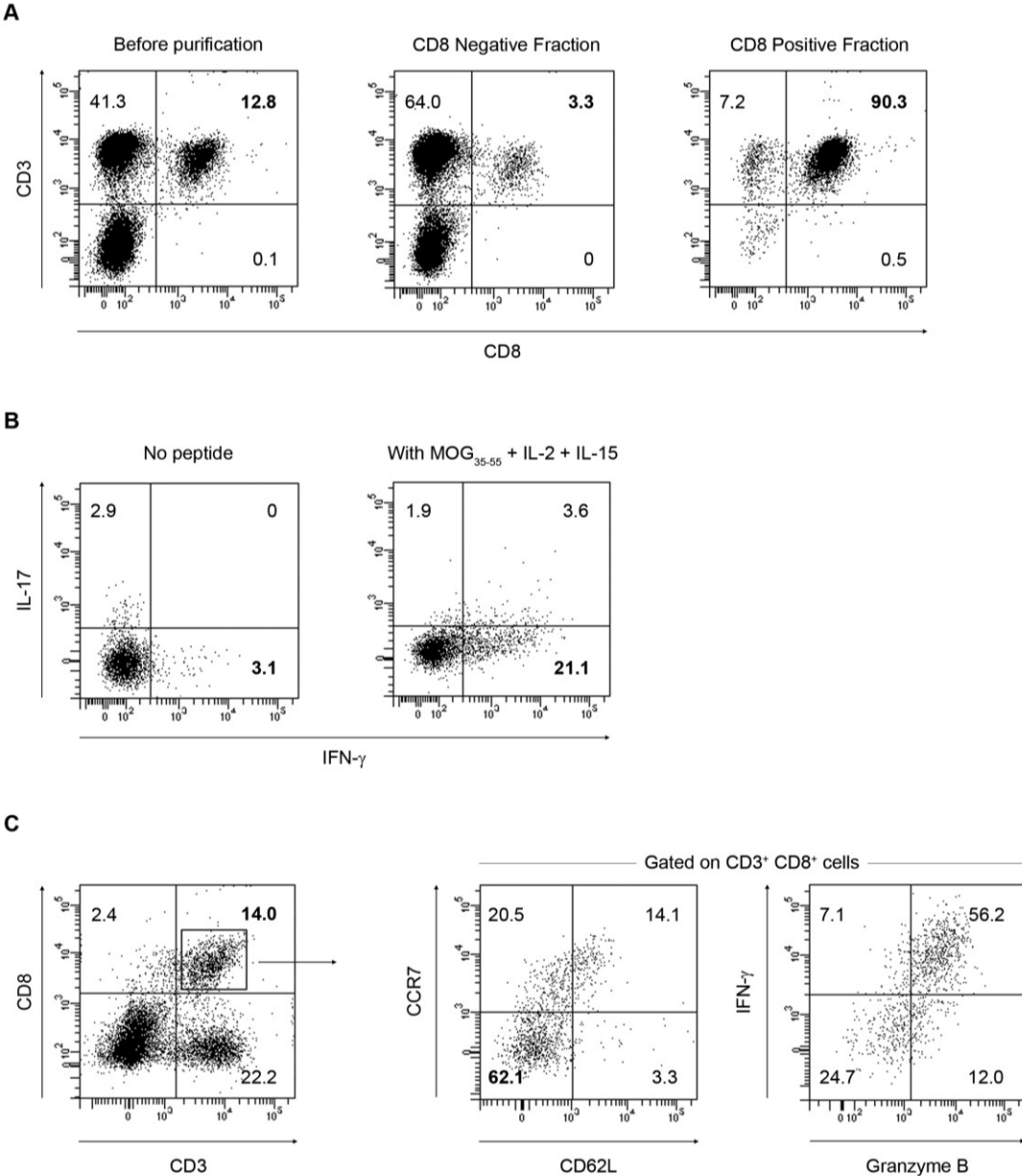


B



Supplementary Figure 4. Profiles of CD8⁺ T lymphocytes transferred and CD8⁺ T lymphocytes found in the CNS compartment of recipient mice. EAE was induced by active immunization of C57BL/6 animals with MOG₃₅₋₅₅/CFA. At day 8 post-immunization, mice were sacrificed and immune cells were isolated from the spleen and lymph nodes. **(A)** After 3 days of reactivation, CD8⁺ T lymphocytes were purified by magnetic beads. The total population before purification is represented on the left panel, the negative fraction of the purification is represented on the center panel, and the positive fraction of the selection is represented on the right panel. **(B)** IFN- γ and IL-17 expression profile by CD8⁺ T lymphocytes after 3 days of reactivation in presence of MOG₃₅₋₅₅, IL-2 and IL-15 (right panel) or without any stimulation (left panel) showing the activation state of the CD8 cells before their transfer into recipient mice. **(C)** Ten millions of MOG-reactivated CD8⁺ T lymphocytes were injected i.p. into recipient mice and profile of CD8⁺ T lymphocytes found in the CNS of recipient mice at day 18 post-transfer was analyzed by flow cytometry. Cells were first gated on CD3⁺ CD8⁺ (left panel) and expression of CCR7 and CD62L (center panel) as well as IFN- γ and Granzyme B (right panel) was assessed. Data shown are representative of 3 mice.

Supplementary Figure 4



DISCUSSION

1. Effets des statines sur la BHE humaine

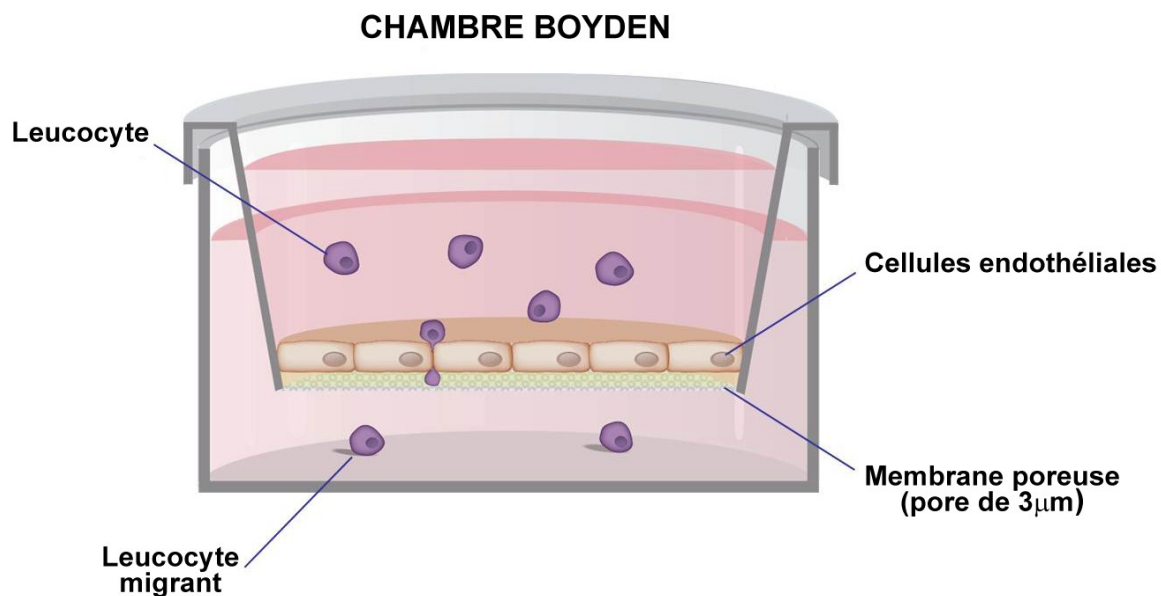
Les statines sont les médicaments les plus prescrits dans le monde dans le but de diminuer les niveaux de cholestérol. Utilisées depuis près de 20 ans, les statines ont démontré leur efficacité, sécurité et tolérance chez un nombre élevé de patients (Calabro and Yeh, 2005). Les statines de première génération (lovastatine, pravastatine et simvastatine) sont d'origine « naturelle » ou semi-synthétique. Les statines les plus récentes de deuxième (fluvastatine) et troisième génération (cerivastatine, atorvastatine, pitavastatine et rosuvastatine) sont des produits entièrement synthétisés en laboratoire (Tobert, 2003).

En plus de réduire le niveau de cholestérol, les études sur les statines ont démontré leur capacité à réduire les indices inflammatoires. En effet, les statines diminuent le taux sérique de cytokines pro-inflammatoires telle que l'IL-1 β , IL-6 et l'IL-8 des patients hypercholestérolémiques et de patients souffrant de maladies coronariennes (Waehre *et al.*, 2003). De plus, trois différentes études ont démontré la capacité des statines (atorvastatine et lovastatine) à inhiber le développement de l'EAE (Aktas *et al.*, 2003; Stanislaus *et al.*, 2002; Youssef *et al.*, 2002). D'ailleurs, il avait été démontré que la lovastatine était en mesure de se lier à la molécule LFA-1 exprimée par les lymphocytes T CD4⁺, ce qui empêchait la liaison entre LFA-1 et ICAM-1 exprimée par les CPA ainsi que les cellules endothéliales. Ainsi, les effets observés en EAE s'expliquaient par le fait que la présentation d'antigènes était atténuée et que la migration des lymphocytes T au SNC était affaiblie. De plus, d'autres études ont révélé que les statines induisaient l'expression de GATA-3 par les lymphocytes T CD4⁺, menant ainsi à un profil de type Th2 (Nath *et al.*, 2004; Youssef *et al.*, 2002).

Le but de notre étude était de déterminer si les statines étaient efficaces pour réduire la transmigration leucocytaire à travers les cellules endothéliales de la BHE, ainsi que d'évaluer l'effet des statines sur la perméabilité des cellules endothéliales de la BHE. Pour effectuer notre étude, nous avons recruté des contrôles sains, des patients RR-MS qui

étaient en période de poussées (dénotés AR-MS dans le manuscrit pour Acutely Relapsing MS patients), ainsi que des patients souffrant d'un syndrome cliniquement isolé (SCI) suggestif de SEP. On dit de ces patients SCI qu'ils ont environ 60-90% de chance de développer d'autres épisodes menant au diagnostic de SEP (Chard *et al.*, 2011). Il s'agit en fait de patients au tout début de leur maladie. Pour évaluer la perméabilité des cellules endothéliales de la BHE suite à un traitement aux statines, nous avons utilisé 2 molécules marquées : l'albumine de sérum bovin (BSA) marquée au fluorescéine-5-isothiocyanate (FITC) et le sucrose marqué avec un isotope radioactif, le carbone 14. La BSA peut traverser la BBB par les deux modes de passages connus, soit le passage paracellulaire et transcellulaire (par transcytose active), alors que le sucrose utilise un mode de passage paracellulaire et reflétant ainsi l'état des JS de la BHE.

Pour examiner la migration et la perméabilité, nous avons utilisé un modèle *in vitro* de la BHE, nommé la chambre de Boyden modifiée (Figure 10). Sur une membrane contenant des pores de 3 μ m, des cellules endothéliales de la BHE, isolées à partir de section de cerveau de patients subissant une intervention chirurgicale pour traiter une épilepsie jusque-là intractable, sont mises en culture sur une couche de gélatine. La gélatine, qui est produite par hydrolyse de collagène, joue le rôle de matrice extracellulaire et permet l'expression des JS de la part des cellules endothéliales (Prat *et al.*, 2001). Le milieu de culture est additionné de facteurs solubles issus de la culture primaires d'astrocytes. Les cellules immunitaires isolées ou les molécules marquées sont placées dans la chambre supérieure, et après un délai de 6 heures (perméabilité) ou 24 heures (migration), le contenu de la chambre inférieure est évalué.



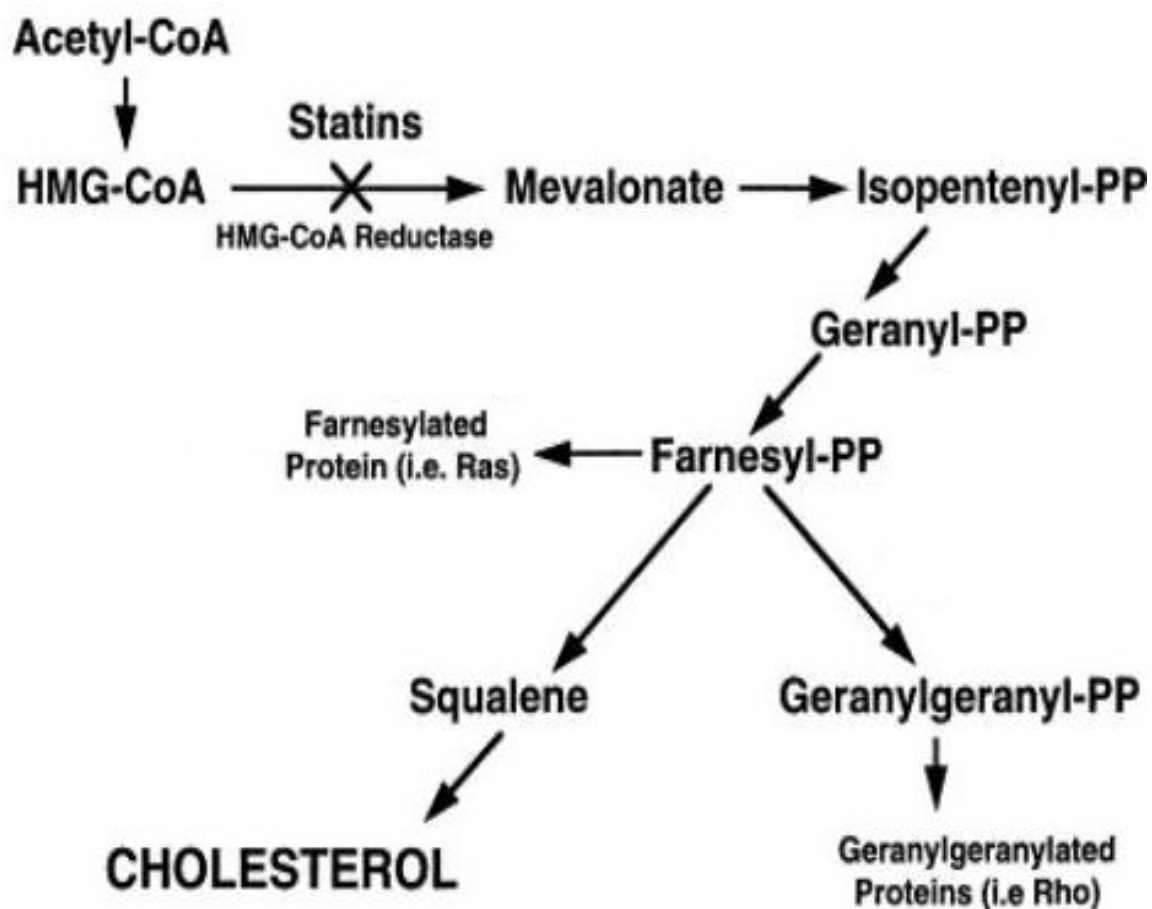
Représentation schématique utilisée avec la permission de Hania Kebir

Figure 10: Modèle *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique.

Les cellules endothéliales de la BHE humaine sont isolées et placées sur une membrane poreuse préalablement recouvert d'une fine couche de gélatine permettant l'adhérence des cellules à la membrane. Les cellules immunitaires (ou traceurs moléculaires marqués) sont placés dans la chambre supérieure et après un délai de 6 heures (pour les traceurs moléculaires) ou 24 heures (pour les cellules immunitaires), le contenu de la chambre inférieure est analysé pour évaluer la perméabilité de la BHE.

Ainsi, dans cette étude nous avons démontré que la Lovastatine et la Simvastatine utilisées à des doses thérapeutiques induisent une réduction de 50 à 60% de la diffusion de la BSA ainsi que du sucrose. Ce phénomène est indépendant de l'expression des molécules de JS dans les cellules endothéliales de la BHE (Occludine, VE-cadherine, JAM-1, ZO-1 et ZO-2). Nous démontrons également que le traitement des cellules endothéliales de la BHE avec la Lovastatine et la Simvastatine permet de diminuer la sécrétion des chimiokines MCP-1 et IP-10, limitant ainsi de manière significative la migration des monocytes et des lymphocytes, isolés à partir du sang de patients atteints de SEP ou de CIS. De manière intéressante, le traitement des cellules endothéliales aux statines n'a eu aucun effet significatif sur l'expression de la molécule d'adhérence ICAM-1.

Pour tenter de comprendre la diminution de la perméabilité observée, nous avons utilisé des bloqueurs de la voie menant à la production de cholestérol. En effet, comme il a déjà été mentionné, les statines sont des inhibiteurs compétitifs de la HMG-CoA réductase et agissent donc en inhibant la voie de biosynthèse du mévalonate. Elles bloquent la transformation de l'HMG-CoA en mévalonate par l'HMG-CoA réductase (Figure 11) ce qui a pour conséquence de réduire le taux de cholestérol, ainsi que tous les autres métabolites situés en aval du mévalonate et plus particulièrement les isoprénoides : les farnésylpyrophosphates (FPP) et les géranylgeranylpyrophosphates (GGPP). Ces derniers interviennent dans les modifications post-traductionnelles, appelées isoprénylations, de différentes protéines de signalisation qui lient et dephosphorylent le GTP. Ainsi, ces isoprénoides sont adjoints, selon un processus dénommé prénylation, aux protéines G au niveau des sous-unités Ras, Rho, Rab, Rac et Rap. L'isoprénylation permet l'ancrage des GTPases à la membrane cellulaire et sont donc indispensables à leurs fonctions.



Adapté de Adam and Laufs, Arch Toxicol, 2008.

Figure 11: Représentation de la voie métabolique du mévalonate.

La biosynthèse du mévalonate conduit à la formation de cholestérol et de plusieurs isoprénoïdes importants pour l'activité des protéines G. Les statines inhibent l'activité de l'enzyme HMG-CoA reductase et réduit donc le taux de cholestérol.

Les GTPases sont connues pour avoir une multitude de fonctions biologiques très variées. Une des plus intéressantes dans le cadre de notre étude se rapporte au rôle des protéines Rho au niveau de la molécule d'adhérence ICAM-1 et de leur capacité à concentrer les molécules d'ICAM-1 dans des micro-domaines membranaires à la surface des cellules endothéliales. Ceci aurait pour conséquence de faciliter la formation de « coupes de migrations » essentielle au processus de diapédèse (Wojciak-Stothard *et al.*, 1999). De plus, il a été démontré que l'activation des protéines de la famille Rho induit une réorganisation du cytosquelette d'actine permettant aux cellules endothéliales de se contracter, ce qui aurait pour conséquence d'augmenter la perméabilité de la BHE (Wojciak-Stothard and Ridley, 2003). Dans ce sens, les statines qui bloquent l'isoprenylation de Rho, inactive donc la voie ICAM-1 utilisée pour la migration de plusieurs sous-types de leucocytes

En utilisant des bloqueurs spécifiques pour la GGPP et la FPP, il nous a été permis de contrecarrer l'effet des statines sur la perméabilité. Par contre, l'inhibiteur spécifique au squalène n'a eu aucun effet sur la perméabilité. Ainsi, il nous est permis de conclure que l'effet des statines sur la perméabilité s'opère via la suppression du processus d'isoprenylation, qui ne permet plus d'activer les GTPases des cellules endothéliales et donc de permettre la contraction des cellules.

Il aurait été intéressant de mesurer l'impact des statines sur le passage moléculaire transcellulaire spécifiquement en utilisant de la transferrine marquée qui ne peut traverser la BHE que via son récepteur exprimé à la surface des cellules endothéliales (Miller *et al.*, 2005). Puisqu'aucune étude n'a évalué l'effet des statines sur l'expression des transporteurs spécifiques, il est difficile de s'avancer sur les conséquences possibles des statines sur le passage transcellulaire. Effectivement, nos données de diffusion de la BSA peuvent ne refléter que l'effet des statines sur le passage paracellulaire puisque la BSA utilise les 2 mécanismes de passages.

Tout comme pour les cellules immunitaires, les statines ont un effet anti-inflammatoire sur les cellules endothéliales en diminuant leur expression de chimiokines, molécules qui sont importantes pour la migration des cellules immunitaires. Ce qui est intéressant, c'est que la réduction de migration par les statines n'a été observée que chez les

patients SEP et CIS, et pas chez les contrôles sains. Il avait déjà été relevé que les cellules des patients SEP avaient des capacités migratoires plus accrues que celles des contrôles (Prat *et al.*, 1999; Prat *et al.*, 2002; Seguin *et al.*, 2003), et ce probablement en raison de leur niveau d'activation plus élevée telle que démontrée par l'expression de MMP-9 (Yong *et al.*, 1998). Les MMPs sont des enzymes protéolytiques secrétées par différents sous types de leucocytes activés et par les cellules gliales, et qui permettent la dégradation et le remodelage de la lame basale (matrice extracellulaire) entourant les micro-vaisseaux. Leur importance biologique au niveau des vaisseaux du SNC a été démontré à de nombreuses reprises, dont en SEP et en EAE (Yong, 2005), mais aussi dans les accidents vasculaires cérébraux (Noble *et al.*, 2002). Dans cette étude nous démontrons donc que les lymphocytes T CD3⁺ et les monocytes de patients CIS possèdent des capacités migratoires comparables à ceux des patients AR-MS. Ainsi, les statines permettent de niveler la migration des deux populations leucocytaires des patients au même niveau que celui des contrôles. Le mécanisme par lequel les statines diminuent la migration des cellules restent encore à préciser, mais on peut supposer que la diminution de sécrétion des chimiokines par les cellules endothéliales de la BHE est au moins en partie responsable de l'effet observé. Il est aussi possible que les statines induisent une réduction d'expression ou de la fonction des MMPs, ce qui aurait pour conséquence une diminution du bris de la barrière vasculaire et de la matrice de la lame basale par les leucocytes et donc un effet anti-migratoire. Cette hypothèse reste cependant à prouver.

De plus, dans notre étude, nous savons que la réduction de la migration observée ne s'est pas effectuée fait pas via l'inhibition de la liaison entre LFA-1 sur les cellules immunitaires et ICAM-1 sur les cellules endothéliales de la BHE puisque les cellules immunitaires n'ont pas été mises en contact avec les statines. Aussi, nous n'avons pas relevé d'effet significatif des statines sur l'expression d'ICAM-1 à la surface des cellules endothéliales. Par contre, il est possible que l'effet observé sur la migration reflète plutôt la capacité de Rho à induire la concentration des molécules d'ICAM-1 dans les « coupes de migration ». Une étude a démontré que la migration des lymphocytes à travers les cellules endothéliales de la BHE était médiée par la signalisation intracellulaire d'ICAM-1 à travers une voie Rho-dépendante (Adamson *et al.*, 1999). Ainsi, une extension naturelle de notre

étude serait d'utiliser des inhibiteurs d'isoprenylation, comme ceux utilisés dans les expériences de perméabilité, pour tenter de neutraliser l'effet des statines sur la migration. Si cette hypothèse est valide, les inhibiteurs spécifiques de l'isoprenylation bloqueraient l'activité de RhoA, qui 1) ne favoriserait plus la concentration d'ICAM dans les microdomaines membranaires et 2) bloquerait l'activation de Rho qui survient suite à la liaison de LFA-1 à ICAM-1. Dans ce contexte le contrôle de la migration des leucocytes par les statines survient au niveau du contrôle de l'isoprenylation de RhoA qui agit au moins à deux niveaux sur ICAM-1, et fort possiblement sur d'autres molécules d'adhérences.

Un élément que nous avons omis d'évaluer dans notre étude est la caractérisation du phénotype des cellules migrantes. En effet, les statines bloquent partiellement la migration des cellules. On peut présumer que la migration des cellules les plus activées est bloquée, mais il aurait été intéressant de tester l'expression des MMPs, des intégrines LFA-1 et VLA-4, des cytokines d'IL-17, d'IFN- γ , des molécules reflétant une activation des lymphocytes soit CD25 et CD69, ainsi que les molécules différenciant les monocytes inflammatoires (CD14⁺ CD16⁺) des monocytes non-inflammatoires (CD14⁺ CD16⁻). Aussi, il aurait été intéressant de tester l'effet des statines sur la migration des sous-populations de lymphocytes T CD3⁺, soit les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Il est fort probable que les statines diminuent la migration des lymphocytes T CD4⁺ puisque les données en EAE montrent une diminution de l'infiltration de cette population. Cependant, aucune donnée n'est disponible quant à l'effet des statines sur la migration des lymphocytes T CD8⁺.

La démonstration chez l'humain que les statines induisent une diminution de la migration des principaux acteurs de la pathologie de la SEP tout en augmentant l'imperméabilité de la BHE valide le potentiel thérapeutique de ces molécules. De plus, le fait qu'un certain nombre de cellules immunitaires est tout même capable de traverser la BHE traitée laisse présager que l'immuno-surveillance du SNC ne serait pas affectée par un traitement aux statines. Récemment, un groupe de recherche a révélé que les statines inhibaient la formation de Th17 *in vitro* (Zhang *et al.*, 2008), ce qui a été confirmé par un autre groupe *in vivo* (Li *et al.*, 2011). Deux études sur des patients RR-MS ont démontré des effets bénéfiques des statines, chacune témoignant d'une réduction des lésions visualisées

par IRM suite à un traitement oral de statines (Paul *et al.*, 2008; Vollmer *et al.*, 2004). Des études de plus grandes envergures sont en ce moment en cours pour tester la validité d'un traitement aux statines en SEP.

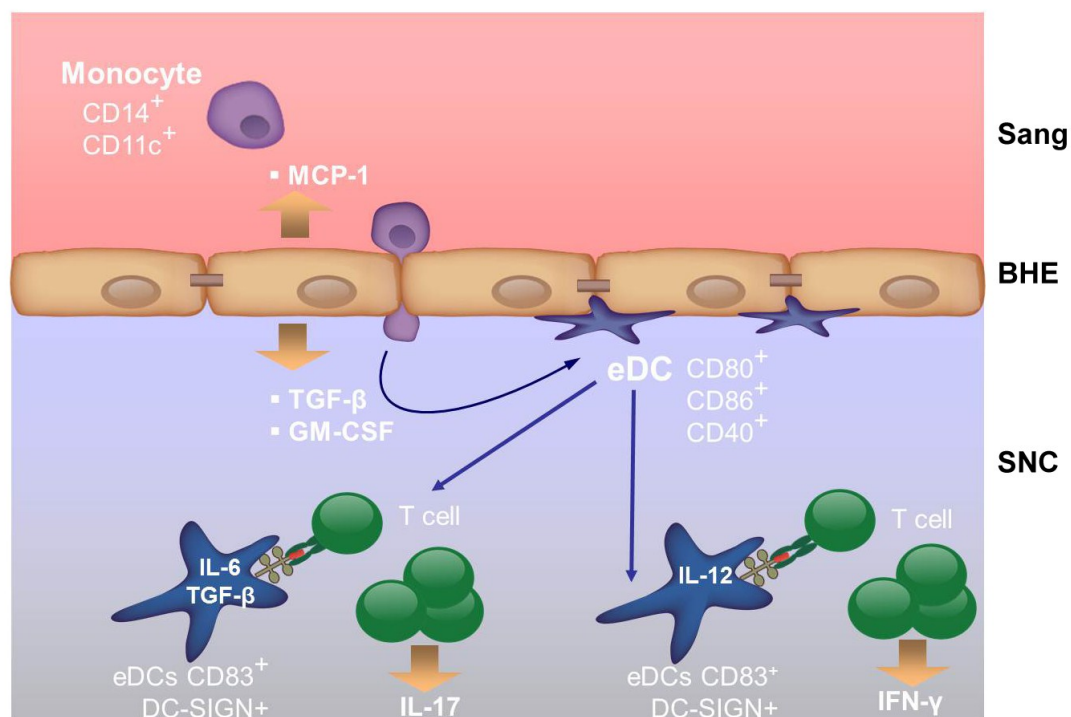
2. Induction de la formation de cellules dendritiques suite à la migration des monocytes à travers la BHE

Avec cette étude nous avons tenté de répondre à une question importante qui restait en suspens en SEP : quelle est la provenance des DCs dans le SNC et de quelle(s) origine(s) sont-ils? Les DCs sont cruciaux pour la réactivation des lymphocytes T CD4⁺ dans le SNC, pour la formation de Th17 et pour l'induction du phénomène d' « epitope spreading » que l'on croit responsable des cycles de poussées en SEP (Bailey *et al.*, 2007; McMahon *et al.*, 2005). Des études ont démontré la présence de DCs dans le SNC de souris présentant l'EAE (Greter *et al.*, 2005; McMahon *et al.*, 2005), ainsi qu'en SEP (Serafini *et al.*, 2000; Serafini *et al.*, 2006). Bien qu'il y ait de nombreuses preuves, autant fonctionnelles qu'histopathologiques, impliquant les DCs dans la formation de lésions en SEP et EAE, la source et les caractéristiques de ces DCs demeurent inconnues. Dans différents organes périphériques et non nerveux, il est connu que les monocytes CD14⁺ du sang périphérique se différencient en DCs en entrant dans l'organe. Cette différenciation dépend de l'environnement inflammatoire ainsi que des caractéristiques des barrières épithéliales ou endothéliales que rencontrent les monocytes (Chomarat *et al.*, 2000; Randolph *et al.*, 1998; Zhang *et al.*, 2004). Ainsi, nous avons émis l'hypothèse que suite à leur migration à travers la BHE, les monocytes se différencient en DCs pour capter les antigènes au niveau du SNC et ainsi diriger la réaction auto-immunitaire. Nos buts étaient: 1) de caractériser le phénotype des monocytes migrant à travers la BHE; 2) d'élucider les signaux moléculaires produits par les cellules endothéliales de la BHE qui permettrait d'induire le changement phénotypique des monocytes et 3) d'évaluer l'impact des monocytes migrants sur l'activation des lymphocytes CD4⁺.

L'étude par Seguin *et al.*, avait préalablement démontré que les monocytes sont en mesure de migrer à travers la BHE et que la chimiokine MCP-1 représente un facteur déterminant pour leur migration (Seguin *et al.*, 2003). En utilisant le modèle *in vitro* de la BHE humaine, nous avons observé qu'une population de monocytes restait en contact avec les cellules endothéliales de la BHE et se différenciait en un phénotype apparenté à celui de

DCs en condition inflammatoire. Nous avons nommé ces cellules « endothelial cell-associated DCs » ou eDCs. Ces cellules présentent le phénotype suivant: HLA-DR^{high}, CD80⁺, CD86⁺, CD40⁺, CD83⁺ et DC-SIGN⁺. De plus, ces eDCs ont une capacité accrue d'endocytose, suggérant qu'ils n'auraient aucun problème à phagocyter. Afin d'identifier des facteurs de la BHE responsables d'induire la différenciation de monocytes en eDCs, nous avons effectué un criblage de cytokines par des expériences de protection à l'ARNase, et confirmés les résultats par ELISA. Nous avons observé une surexpression significative des cytokines GM-CSF (Granulocyte-Macrophage Colony Stimulating Factor) et TGF- β produites par les cellules endothéliales de la BHE. À l'aide d'anticorps bloquants, nous avons été en mesure de démontrer que cette différenciation était due à la production de ces deux cytokines par les cellules endothéliales inflammées. De plus, l'inhibition des molécules d'adhérence, ICAM-1 et VCAM-1, a également permis d'empêcher la différenciation des monocytes en DCs. Et puisque l'environnement dans lequel se trouvent les lymphocytes détermine leur profil, nous avons analysé les cytokines produites par les eDCs. L'analyse des surnageant de culture des eDCs a dévoilé que ces cellules sécrètent des niveaux significativement plus élevés d'IL-12p70, de TGF- β et d'IL-6 en comparaison aux monocytes CD14⁺ d'origines et aux monocytes ayant complètement migré. Nous avons également démontré que la co-culture des eDCs avec des lymphocytes T CD4⁺ induit leur prolifération et l'expansion de 2 sous-populations distinctes : une première population productrice d'IFN- γ évocateur des lymphocytes Th1, et une seconde population productrice d'IL-17 évocateur des lymphocytes Th17. Par immunohistofluorescence sur des biopsies de SNC présentant des plaques de démyélinisation typique de la SEP, nous avons confirmé la présence des marqueurs caractéristiques aux DCs. Ainsi, nous retrouvons plusieurs cellules positives pour les marqueurs CD83 et DC-SIGN. Ces cellules sont en contact étroit avec les cellules endothéliales, suggérant que les eDCs possèdent un rôle dans le développement des lésions de SEP. Nous observons également une population abondante de lymphocytes T CD4⁺ productrice d'IL-17. Nos données démontrent donc que les DCs de type myéloïde retrouvés dans le CNS proviennent de monocytes qui ont migré à travers la BHE (Figure 12), sous l'influence du GM-CSF et du TGF- β secrétées par l'endothélium inflammé.

L'importance du GM-CSF en SEP et EAE a été démontrée à maintes reprises. En premier lieu, les souris GM-CSF KO sont résistantes à l'induction de l'EAE (King *et al.*, 2009; McQualter *et al.*, 2001). De plus, l'injection répétée de GM-CSF recombinant aux souris GM-CSF KO rétablit leur susceptibilité à l'EAE, et ce, par la mobilisation des CPAs inflammatoires (CD11b⁺ Ly6C⁺) dans le sang périphérique. Ces CPAs inflammatoires vont par la suite migrer au sein du SNC et acquérir les caractéristiques de DCs (CD11c⁺) (King *et al.*, 2009). Également, des expériences de chimères de moelle osseuse ont démontré que les cellules myéloïdes de la périphérie et non les microglies sont les principaux répondeurs du GM-CSF produit en EAE (Codarri *et al.*, 2011). Effectivement, les souris dont les CPAs périphériques sont incapables de répondre au GM-CSF ne développent pas d'EAE alors que les souris dont les microglies sont incapables de répondre au GM-CSF développent des EAE comparables aux souris WT. En plus, le GM-CSF induit la production d'IL-23 par les CPAs et permet donc de favoriser un phénotype Th17 (Codarri *et al.*, 2011). D'ailleurs, les lymphocytes T CD4⁺ provenant de souris GM-CSF KO sont incapables d'induire l'EAE, et ce même si ces lymphocytes produisent de l'IL-17 ou de l'IFN- γ . Par contre, les lymphocytes T CD4⁺ qui proviennent de souris IFN- γ KO ou IL-17 KO sont tout de même capables d'induire un EAE (Codarri *et al.*, 2011). Ces dernières données suggèrent que la production de GM-CSF serait plus importante que la sécrétion des cytokines spécifiques aux sous-types lymphocytaires. Ainsi, ces observations combinées avec les données de cette étude nous permettent d'affirmer que le GM-CSF joue un rôle important dans le développement des lésions inflammatoires.



Représentation schématique utilisée avec la permission de Hania Kebir

Figure 12: Schéma récapitulatif de l'étude sur les eDCs.

En condition inflammatoire, les cellules endothéliales de la BHE augmentent leur expression de MCP-1 attirant les monocytes de la périphérie. La présence de TGF-β et de GM-CSF produit par les cellules endothéliales induit la différenciation des monocytes en eDCs, exprimant les molécules de costimulation CD80, CD86 et CD40, en plus d'exprimer les marqueurs exclusifs au DCs, soit CD83 et DC-SIGN. Les eDCs sont en mesure d'induire une réponse de type Th1 de par leur sécrétion d'IL-12p70, et une réponse de type Th17 de par leur production d'IL-6 et TGF-β.

Pour le TGF- β , c'est une molécule qui est pour l'instant difficile à cerner. Elle est impliquée autant dans les processus anti-inflammatoire via les Tregs que dans les processus inflammatoire en favorisant l'expansion des lymphocytes Th17 (Qin *et al.*, 2009). De plus, il a déjà été rapporté qu'en compagnie d'IL-4 ou d'IL-6, le TGF- β était en mesure d'induire la formation de DCs à partir de monocytes (Caux *et al.*, 1999; Ginhoux *et al.*, 2006).

En plus des cytokines, l'attachement aux cellules endothéliales de la BHE via les molécules d'adhérence ICAM-1 et VCAM-1 s'est révélé d'une importance primordiale dans la migration des monocytes à travers la BHE en plus d'être impliqués dans la différenciation des monocytes en eDCs.

La production d'IL-6, de TGF- β et d'IL-12p70 par les eDCs permettent l'induction des phénotypes Th17 et Th1, les deux phénotypes répertoriés comme étant responsable de la SEP. Ainsi cette étude nous permet de conclure que la BHE n'est pas une simple barrière filtrante, mais joue un rôle actif en inflammation en promouvant la différenciation des monocytes en DCs capables de phagocyter des antigènes et d'initier des réponses inflammatoires, en polarisant la production de cytokines par les lymphocytes mémoires, vers un phénotype pro-inflammatoire Th1 et Th17.

3. Ninjurin-1 est une molécule d'adhérence de la BHE permettant le recrutement spécifique des cellules de lignée monocytaire

Comme nous l'avons vu dans la section précédente, en condition inflammatoire, la migration des monocytes à travers les cellules endothéliales de la BHE conduit à la formation de DCs. En plus d'être efficaces pour induire des réponses de type Th1 et Th17 par les lymphocytes T CD4⁺ dans le SNC, les DCs sont en mesure d'accéder aux organes lymphoïdes secondaires et qu'ils représentent les CPAs les plus efficaces pour activer les lymphocytes T CD4⁺ naïfs. La migration des monocytes à travers l'endothélium vasculaire constitue donc une cible thérapeutique intéressante dans le but de freiner le développement de la SEP. Et tel qu'il a été mentionné dans l'introduction, l'ablation des CPAs périphérique par des procédés génétiques ou chimiques conduit à l'inhibition de l'EAE, renforçant le besoin d'identifier des mécanismes moléculaires spécifiques médiant la transmigration de ces cellules au sein du SNC (Ajami *et al.*, 2011; Greter *et al.*, 2005; Tran *et al.*, 1998).

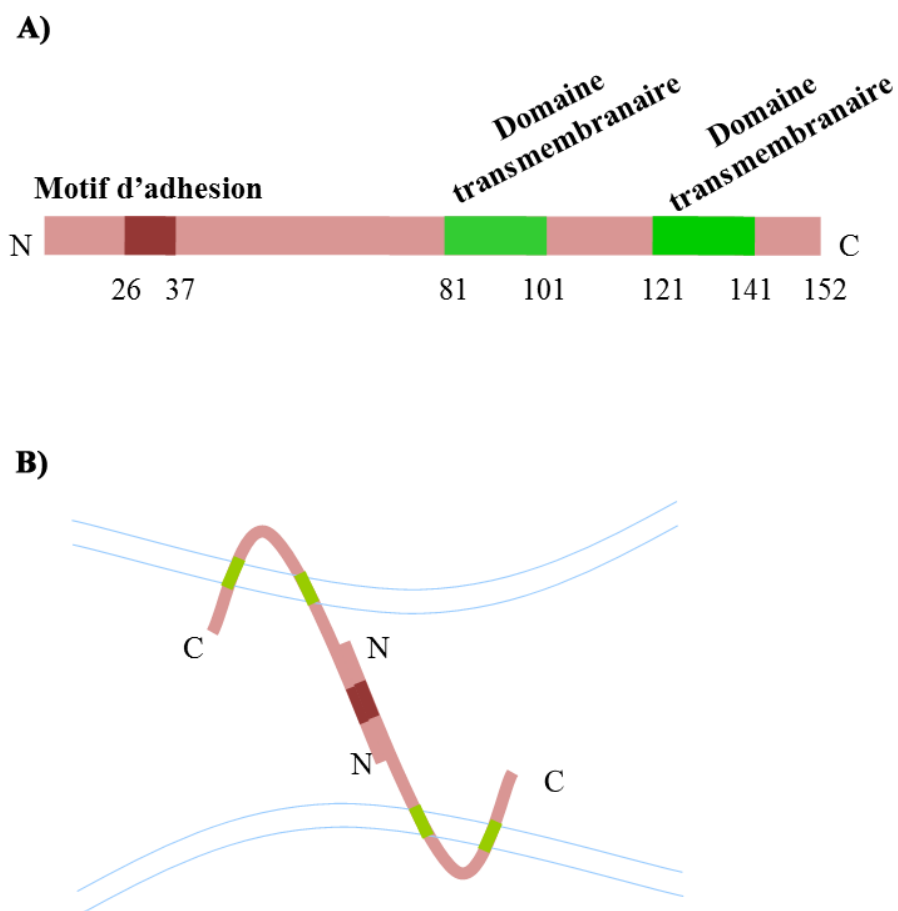
Les thérapies ciblant l'intégrine $\alpha 4$ permettent d'inhiber la migration des CPAs périphérique au SNC, mais elles ne constituent pas une approche spécifique ou ciblée, puisqu'autant les lymphocytes que les monocytes et la majorité des granulocytes expriment l'intégrine $\alpha 4$ (Theien *et al.*, 2001). Les bloquants de cette intégrine compromettent donc l'immuno-surveillance du SNC telle que l'on peut le constater, à la découverte de nombreux cas de LEMP répertoriés suite au traitement avec le Natalizumab. Mais tout porte à croire que le blocage spécifique et ciblé de la migration des CPAs périphériques par l'entremise d'un anticorps pourrait mener à une éventuelle thérapie en SEP.

Dans le but d'identifier de nouvelles molécules d'adhérence de la BHE qui pourraient être spécifiques aux CPAs périphérique, nous avons procédé à une analyse protéomique des radeaux lipidiques des cellules endothéliales de la BHE (Cayrol *et al.*, 2011; Cayrol *et al.*, 2008). Les radeaux lipidiques constituent un domaine de la membrane plasmique riche en cholestérol servant de plateforme de tri et de signalisation. Dans les

cellules endothéliales de la BHE, les radeaux lipidiques ont été identifiés dans les « coupes de migration » (Carman and Springer, 2004). L'analyse de ces microdomaines membranaires isolés à partir de nos cultures primaires de cellules endothéliales de la BHE humaine, fut effectuée par chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse en tandem. Ceci nous a permis d'identifier de nombreuses protéines, particulièrement des protéines qui pourraient potentiellement être impliquées dans l'adhésion et migration des cellules immunitaires. L'une de ces protéines d'intérêt se nomme Ninjurin-1 (Nerve injury-induced protein).

Ninjurin-1 avait été identifiée comme une molécule d'adhérence exprimée par les neurones et les cellules de Schwann, permettant les interactions entre les cellules gliales et les cellules nerveuses dans le système nerveux périphérique (Araki and Milbrandt, 1996). Ninjurin-1 se lie de manière homophylique par son motif d'adhésion extracellulaire situé entre la proline en position 26 et l'asparagine en position 37 (Figure 13). En 2009, une étude a révélé que Ninjurin-1 était surexprimée dans le SNC en EAE, particulièrement par les monocytes/macrophages et les cellules endothéliales (Ahn *et al.*, 2009). Nous avons donc émis l'hypothèse que Ninjurin-1 contrôlait la migration des cellules de lignée monocyttaire et que la modulation de cette molécule permettait d'inhiber le développement d'EAE.

Dans le but de répondre à notre hypothèse, nous avons évalué en premier lieu l'expression de Ninjurin-1 à la surface des cellules endothéliales de la BHE. Nous démontrons que Ninjurin-1 est exprimé par les cellules endothéliales, et que cette expression est augmentée en condition inflammatoire. Et puisque Ninjurin-1 se lie de manière homophylique, nous avons donc analysé l'expression de Ninjurin-1 par les cellules immunitaire en périphérie. Alors que les lymphocytes exprimaient des niveaux à peine détectables de Ninjurin-1, plus de 50% des monocytes en exprimaient. De plus, les macrophages et les DCs formés *in vitro* à partir de monocytes augmentaient cette expression de Ninjurin-1. En SEP et en EAE, Les CPAs infiltrantes retrouvées dans les lésions cérébrales exprimaient de hauts niveaux de Ninjurin-1 confirmant la pertinence d'étudier cette molécule.



Représentation schématique utilisée avec les permissions de Simone Terouz et Hania Kebir

Figure 13: Représentation schématique de la molécule et de la liaison homophile de Ninjurin-1.

(A) Ninjurin-1 est une protéine de 152 aa qui contient deux régions transmembranaires et deux régions extracellulaires.. Ninjurin-1 contient un motif d'adhérence aux positions 26 à 37 situé dans la région extracellulaire N-terminale. **(B)** Le motif d'adhérence de Ninjurin-1 médie une interaction de type homophile. Ninjurin-1 se lie à une autre molécule Ninjurin-1 sur une autre cellule adjacente.

À l'aide du modèle *in vitro* de la BHE et d'un système de flow mimant la circulation sanguine au sein de capillaires, la neutralisation de Ninjurin-1 a restreint spécifiquement l'adhésion et la migration des monocytes à travers la BHE sans affecter le recrutement des lymphocytes. Enfin, les souris atteintes d'EAE et traitées avec un anticorps bloquant dirigé contre Ninjurin-1 ou un peptide reproduisant le motif d'adhésion présentaient une maladie moins sévère ainsi qu'une diminution des CPAs infiltrant le SNC.

Ainsi, notre équipe fut la première à identifier une molécule régissant spécifiquement la migration d'un sous-type cellulaire, soit les CPAs. Un des aspects intéressant de cette étude c'est que Ninjurin-1 est exprimé de manière plus accentuée sur les CPAs inflammatoires (CD11b⁺ Ly6C⁺). Il a été démontré qu'un enrichissement de cette population en périphérie menait à une maladie d'EAE plus rapide et plus sévère (King *et al.*, 2009). L'analyse du contenu du SNC de souris 16 jours post-induction permet de conclure que le traitement avec l'anticorps bloquant dirigé contre Ninjurin-1 diminue l'infiltration des CPAs inflammatoires. De plus comme pour les autres molécules d'adhérence (ICAM-1, VCAM-1 et ALCAM), se concentre aussi au sein des « coupes de migration » formées avec les monocytes migrants, démontrant une nouvelle fois son rôle de molécule d'adhérence.

Un autre aspect intéressant que l'on peut retenir de cette étude, c'est que la présentation d'antigène aux lymphocytes T CD4⁺ n'est pas affectée par le blocage de Ninjurin-1. Ceci s'explique par le fait que les lymphocytes n'expriment que très peu de Ninjurin-1, et suggère que Ninjurin-1 n'est pas impliqué dans la formation de synapses immunologiques, c'est-à-dire dans la liaison entre les CPAs et les lymphocytes s'effectuant lors de la présentation d'antigènes. De plus, les expériences *in vitro* démontrent que les lymphocytes conservent les mêmes capacités migratoires en présence de bloquants de Ninjurin-1. Cependant, *in vivo*, nous constatons une réduction significative du nombre de lymphocytes T CD4⁺ retrouvés dans le SNC de souris traitées avec l'anticorps dirigé contre Ninjurin-1. Cette réduction ne constituait pas une surprise puisque les études d'ablation de CPAs périphériques constataient également une réduction au niveau de l'infiltration des lymphocytes T CD4⁺ au sein du SNC (Ajami *et al.*, 2011; Greter *et al.*, 2005). Et bien que nous ne l'ayons pas démontré dans l'étude, cette réduction s'explique fort probablement par

la réduction de CPAs capables d'induire la prolifération *in situ* dans le SNC des lymphocytes T CD4⁺. De manière intéressante, le dénombrement des lymphocytes T CD8⁺ *in vivo* n'est pas affecté par le traitement anti-Ninjurin-1. Ceci peut s'expliquer par deux moyens : le premier, c'est que le peptide MOG₃₅₋₅₅ injecté pour induire l'EAE est capté par les CPAs qui le présentent par leur CMH de classe II induisant principalement l'activation des lymphocytes T CD4⁺. Et le second argument c'est que les lymphocytes T CD8⁺ accédant le SNC sont très possiblement indépendants des CPAs pour leur réactivation. Ce deuxième élément reste cependant à démontrer.

À l'origine, Ninjurin-1 avait été identifiée dans une analyse génétique cherchant à identifier les gènes dont l'expression augmente suite à une lésion nerveuse périphérique (Araki and Milbrandt, 1996). Il avait été montré que suite à une lésion nerveuse périphérique, Ninjurin-1 est transportée à travers l'axone et s'accumule au site de lésion nerveuse dans le but de faciliter la régénération axonale via des interactions de type homophile (Ninjurin-1-Ninjurin-1) entre les axones neuronaux et les cellules de Schwann. Il était donc permis de penser que Ninjurin-1 pourrait avoir une fonction similaire dans le SNC. Cependant, une analyse préliminaire des oligodendrocytes, l'équivalent des cellules de Schwann dans le SNC, ainsi que des neurones dans les lésions de patients SEP nous a révélé que ces cellules n'expriment pas de Ninjurin-1. Cependant des études plus approfondies sont nécessaires. Ces études doivent être complétées par des études vérifiant la capacité de l'anticorps bloquant de Ninjurin-1 à travers la BHE.

Cette étude met de nouveau de l'avant l'apport important des CPAs périphériques à la pathogénèse de l'EAE puisque l'inhibition d'entrée spécifique de ces cellules mène à une amélioration significative des signes clinique. De plus, il est permis de penser que l'immuno-surveillance ne serait pas compromise par un tel traitement puisque les lymphocytes n'expriment que de très faibles niveaux de Ninjurin-1. Leur réactivation au sein du SNC, en cas d'infection virale, pourrait se faire par les microglies.

Cependant, il reste encore à déterminer le rôle de Ninjurin-1 dans la capacité à induire un changement phénotypique de la part des monocytes. Il est permis de supposer qu'en effectuant le même genre d'expérience que pour le second manuscrit dans lequel il est décrit que les monocytes se différencient en DCs suite à leur migration à travers les

cellules endothéliales de la BHE, l'ajout d'un anticorps dirigé contre Ninjurin-1 diminuerait le taux de différenciation d'un phénotype de monocyte à un phénotype de DCs.

Finalement, il serait intéressant d'étudier le rôle de Ninjurin-1 sur la migration des DCs plasmacytoïdes (pDCs). Les pDCs représentent une sous-catégorie de DCs aux caractéristiques différentes de celles des DCs conventionnelles (nommées DCs myéloïdes en raison de leur cellule précurseur) (Barchet *et al.*, 2005). Elles jouent un rôle majeur dans la défense immunitaire contre les virus de par leur capacité à sécréter de grande quantité d'IFN de type 1 ce qui active les cellules NK et lymphocytes T CD8⁺ (Colonna *et al.*, 2004). En EAE, il a été démontré que les pDCs dans le SNC induisent l'expansion des lymphocytes T CD4⁺ de phénotype Th2 et permettent de réduire l'inflammation cérébrale (Bailey-Bucktrout *et al.*, 2008). De plus, l'ablation du MHC de classe II à la surface des pDCs induit une maladie d'EAE plus sévère avec une réduction significative de lymphocytes Tregs retrouvés dans le SNC des souris (Irla *et al.*, 2010). Ainsi, l'intérêt pour les pDCs en EAE et en SEP devient de plus en plus marqué, particulièrement en raison des données actuelles suggérant que les pDCs seraient impliqués dans l'induction d'un profil anti-inflammatoire de la part des lymphocytes T CD4⁺. Et puisque les pDCs proviennent d'un précurseur différent de celui mDCs, il est tout à fait envisageable de penser que ces cellules n'utilisent pas les mêmes molécules d'adhérence que les mDCs, mais ceci reste à étudier.

4. Le recrutement des lymphocytes T CD8⁺ effecteurs mémoires dans le système nerveux central est dépendant de l'α4 intégrine

L'étude des lymphocytes T CD8⁺ en SEP a été plutôt limitée jusqu'ici, la majeure partie des recherches s'effectuant plutôt sur les lymphocytes T CD4⁺. Ceci s'explique par le fait que la plus forte association génétique de développer la SEP est liée à l'allèle HLA-DRB1*1501, et par le fait que le modèle animal de la SEP est induit et transférable par les lymphocytes T CD4⁺. Ainsi, bien qu'on retrouve des lymphocytes T CD8⁺ au niveau de lésions de SEP et EAE, très peu d'études se sont penchées sur le rôle potentiel de ces cellules en SEP. Cependant, l'émergence des LEMP chez les patients SEP traités par le natalizumab a fait ressortir le manque flagrant de connaissances de la communauté scientifique sur les lymphocytes T CD8⁺ en SEP, et plus particulièrement sur les molécules impliquées dans leur migration au SNC. Ainsi, notre étude s'est penchée sur le phénotypage des lymphocytes T CD8⁺ qui accèdent au SNC et sur les mécanismes moléculaires dirigeant cette migration. En prenant en considération l'émergence d'infections virales au sein du SNC chez les patients traités avec des thérapies ciblant l'intégrine α4, nous avons émis l'hypothèse que l'intégrine α4 gouverne la migration des lymphocytes T CD8⁺ au sein du SNC. De plus, puisque les TEM sont responsables du contrôle des infections au virus JC (Du Pasquier *et al.*, 2003; Du Pasquier *et al.*, 2004), nous avons émis l'hypothèse que les TEM accèdent au SNC via l'entremise de cette intégrine α4.

Afin d'identifier le phénotype des lymphocytes T CD8⁺ infiltrant le cerveau en condition inflammatoire, nous avons utilisé 3 différents outils. Nous avons analysé le LCR de patients RR-MS, le SNC de souris EAE induit à l'aide du peptide MOG₃₅₋₅₅ ainsi que le SNC de souris infectées avec le virus MHV-A59. Ce dernier modèle est couramment utilisé par le groupe du Dr. Talbot avec le lequel nous avons collaboré pour cette étude. L'injection du MHV atténué par voie intracérébrale induit une encéphalite chronique caractérisée par l'infiltration de cellules immunitaires au niveau de la moelle épinière et du cerveau ainsi qu'une démyélinisation. Dans le modèle utilisé dans l'étude, le virus est

éliminé 7 jours post-infection par une réponse immunitaire dominée par les lymphocytes T CD8⁺ (Bender and Weiss, 2010; Gruslin *et al.*, 2005). De plus, l'intérêt de ce modèle en comparaison avec le modèle d'EAE induit par le peptide MOG₃₅₋₅₅, c'est qu'aussi bien l'élimination virale que la démyélinisation sont induits par les lymphocytes T CD8⁺. Ainsi, à l'aide de ces 3 outils, nous avons identifié les lymphocytes T CD8⁺ ayant un phénotype TEM, c'est-à-dire CCR7⁻ CD62L⁻ Granzyme B⁺, comme étant la principale population de lymphocytes T CD8⁺ infiltrant le SNC en condition inflammatoire. Nous avons confirmé les aptitudes migratoires plus prononcées des TEM en comparaison avec les autres populations de lymphocytes T CD8⁺ à l'aide de notre modèle *in vitro* de la BHE humaine. De plus, les lymphocytes T CD8⁺ migrants ont une capacité accrue d'exprimer de l'IFN- γ que les lymphocytes non-migrants, indiquant un rôle possible des lymphocytes T CD8⁺ dans l'inflammation cérébrale en SEP. Finalement, nous démontrons que la migration des lymphocytes T CD8⁺ est dépendante de l'intégrine α 4. Nous avons constaté le rôle crucial de l'intégrine α 4 pour la migration des lymphocytes T CD8⁺ dans notre modèle *in vitro* de la BHE humaine et dans 3 modèles animaux : par le modèle d'immunisation actif d'EAE à l'aide du peptide MOG₃₅₋₅₅, par le modèle d'immunisation passif à l'aide du transfert de lymphocytes T CD8⁺ activés en présence de MOG₃₅₋₅₅ et par le modèle d'infection virale intracérébrale par la souche MHV-A59.

En SEP, le prélèvement du LCR représente le seul spécimen biologique permettant l'analyse du contenu cellulaire du cerveau. Il est difficile de savoir si le contenu cellulaire du LCR reflète adéquatement les acteurs participants à l'inflammation cérébrale en SEP. Cependant, comme il a déjà été indiqué dans l'introduction, l'accumulation d'immunoglobulines dans le LCR représente fidèlement une activité inflammatoire du SNC. De plus, il est généralement accepté qu'un blocage de l'entrée des leucocytes à travers la BHE inhibe également l'accumulation dans le LCR, comme on a pu l'observer chez les patients SEP traités au natalizumab (Stuve, 2008; Stuve *et al.*, 2006a) ou au rituximab (Rommer *et al.*, 2011). Cependant, bien qu'il soit possible que les cellules retrouvées dans le LCR participent à l'inflammation cérébrale, on ne peut exclure le fait que ces cellules n'ont tout simplement pas trouvé leur cible antigénique dans le cerveau et/ou moelle épinière, et retournent dans la circulation via la barrière sang-LCR. Ainsi, dans

cette étude, nous démontrons une accumulation de lymphocytes T CD8⁺ EM dans le LCR de patients RR-MS en comparaison aux cellules retrouvées dans la périphérie des mêmes patients. Pour atteindre le LCR, les cellules immunitaires doivent nécessairement traverser une des deux barrières du cerveau, et fort probablement la BHE, tel qu'expliqué en introduction. Et c'est la raison qui explique l'utilisation de notre modèle *in vitro* de la BHE humaine qui nous a permis d'observer une augmentation du taux de TEM ayant traversé la BHE en comparaison aux populations de départ. De plus, nous avons aussi observé une accumulation préférentielle de cellules productrices d'enzymes cytolytiques (Granzyme B et Perforine) dans la chambre inférieure, et noté également une augmentation du nombre de lymphocytes T CD8⁺ producteur d'IFN- γ et d'IL-17.

Suite à ces données, nous avons émis l'hypothèse que la BHE était responsable d'un changement phénotypique de la part des lymphocytes T CD8⁺ migrant en induisant les caractéristiques effecteurs mémoires. Afin de répondre à cette hypothèse, nous avons isolé les lymphocytes T CD8⁺ sur la base de leur expression de CD62L. La migration trans-BHE n'a pas induit de changements phénotypique des lymphocytes T CD8⁺ CD62L⁺, et nous a permis de démontrer que les lymphocytes T CD8⁺ EM possèdent simplement une capacité migratoire accrue, par rapport au reste de la population de lymphocytes T CD8⁺.

Pour nous assurer de la pertinence de poursuivre l'étude des TEM en SEP, nous avons analysé des coupes de cerveau de patients. Bien que des lésions avec des foyers d'infiltrations cellulaires importants aient été retrouvées, il fut particulièrement difficile d'identifier des lymphocytes T CD8⁺ au sein de ces lésions, tel que décrit dans quelques publications (Booss *et al.*, 1983; Hayashi *et al.*, 1988). Il est difficile d'expliquer cette divergence, mais il est possible que les méthodes de conservation des tissus, les différents anticorps utilisés, les microscopes puissent justifier cette disparité au niveau des résultats. Néanmoins, au niveau du parenchyme, à l'écart des lésions, nous avons pu retrouver quelques foyers inflammatoires contenant des lymphocytes T CD8⁺. La majorité des lymphocytes T CD8⁺ retrouvés dans le parenchyme de patients SEP exprimaient l'enzyme cytolytique Granzyme B ainsi que la cytokine pro-inflammatoire IFN- γ , caractérisant ainsi la capacité effectrice de ces cellules dans le SNC.

Il est également intéressant de noter que dans le modèle d'immunisation active d'EAE, nous avons observé que plus de 80% des lymphocytes T CD8⁺ dans le SNC possèdent un profil EM avant le début des symptômes cliniques. Avec l'évolution de la maladie et l'apparition des symptômes cliniques, il y a une réduction du dénombrement des TEM dans le SNC. Cette réduction peut s'expliquer par le fait que plus la maladie avance, plus la BHE est perméable, permettant ainsi l'entrée des cellules qui en temps normal seraient incapables de pénétrer dans le SNC. Il est également possible qu'il y ait différentes molécules exprimées par la BHE avec l'infiltration cellulaire ce qui permet le recrutement de différents sous-types de cellules. De plus, peu importe le modèle *in vivo* utilisé, que ce soit l'immunisation active, le transfert passif d'EAE ou le modèle d'infection par le MHV, les lymphocytes T CD8⁺ EM représentent constamment la population dominante des lymphocytes T CD8⁺ retrouvée dans le SNC en condition inflammatoire.

En ce qui a trait au mécanisme moléculaire de migration, nous démontrons que la migration des lymphocytes T CD8⁺ au sein du SNC est directement dépendante de l'intégrine α_4 . En effet, dans le but d'élucider les molécules dirigeant la migration des lymphocytes T CD8⁺ à travers les cellules endothéliales de la BHE, nous avons testé un large éventail de molécules connues pour être importantes dans la migration des leucocytes. C'est ainsi que nous révélons que la migration des lymphocytes T CD8⁺ à travers la BHE est indépendante des interactions intégrine α_L -ICAM-1, ALCAM-CD6, PECAM-1-PECAM-1 et MCP-1-CCR2. Puisqu'il a été démontré dans le passé que chacune de ces molécules participe à la migration des lymphocytes T CD4⁺ (l'intégrine α_L , ALCAM, CCR2) (Cayrol *et al.*, 2008; Greenwood *et al.*, 1995; Prat *et al.*, 2002), des monocytes (l'intégrine α_L , ALCAM, CCR2, PECAM-1) (Cayrol *et al.*, 2008; Muller *et al.*, 1993; Seguin *et al.*, 2003), des lymphocytes B (l'intégrine α_L , ALCAM, CCR2) (Alter *et al.*, 2003; Cayrol *et al.*, 2008) et des neutrophiles (l'intégrine α_L et PECAM-1) (Choi *et al.*, 2009), et qu'aucune de ces molécules n'affectent la migration des lymphocytes T CD8⁺, nous pouvons conclure que les lymphocytes T CD8⁺ utilisent un mécanisme moléculaire plus restreint pour accéder au SNC. Il est possible que d'autres molécules d'adhérence et de

chimiokines participent à la migration des lymphocytes T CD8⁺, mais il demeure certain que l'intégrine $\alpha 4$ y joue un rôle crucial.

L'intégrine $\alpha 4$ peut former un hétérodimère en se liant avec la sous-unité $\beta 1$ pour composer la molécule VLA-4 ou avec la sous-unité $\beta 7$ pour la molécule LPAM-1 (Lymphocyte Peyer's patch Adhesion Molecule 1). Les deux molécules sont abondamment exprimées par les lymphocytes, mais en plus, VLA-4 est exprimé par les monocytes. Elles ont plusieurs ligands dont VCAM-1, MAdCAM-1 et la fibronectine (Berlin *et al.*, 1995; Luster *et al.*, 2005; von Andrian and Engelhardt, 2003). L'inhibition de la liaison de ces ligands à la molécule LPAM-1 ou simplement à la sous-unité $\beta 7$ n'a eu aucun effet sur le développement de l'EAE, alors que l'inhibition de la liaison entre la molécule VLA-4 et ses ligands a réduit significativement les signes cliniques de l'EAE (Doring *et al.*, 2011; Engelhardt *et al.*, 1998). Ces données suggèrent que l'inhibition d'interaction de la molécule VLA-4 avec ses ligands représente le mécanisme responsable des effets bénéfiques observés sur les patients SEP traités au natalizumab.

De plus, puisque la réaction immunitaire menant à la démyélinisation dans le modèle d'immunisation actif d'EAE est menée par les lymphocytes T CD4⁺, et que nous voulions vérifier nos hypothèses dans des modèles de démyélinisation menés par les lymphocytes T CD8⁺, nous avons utilisé le modèle d'infection virale par la souche MHV-A59 et un modèle de transfert de lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour le peptide MOG₃₅₋₅₅. Les souris receveuses de lymphocytes T CD8⁺ activés n'ont développé que des symptômes très légers, ce qui concorde avec la majorité des études récentes démontrant la difficulté de transférer la maladie d'EAE suite à un transfert de lymphocytes T CD8⁺ (Bettini *et al.*, 2009; York *et al.*, 2010b).

Ainsi, cette étude permet de faire un rapprochement aisé entre les cas de LEMP observés chez les patients atteints de SEP et le traitement au natalizumab. Étant donnée qu'il a déjà été démontré que le contrôle des infections au virus JC responsable des cas de LEMP s'effectuait via les lymphocytes T CD8⁺ EM (Du Pasquier *et al.*, 2003; Du Pasquier *et al.*, 2004), nous démontrons dans cette étude que cette population constitue celle que l'on retrouve en plus grand nombre parmi les lymphocytes T CD8⁺ dans le SNC tant chez l'humain que chez la souris. De plus, l'utilisation des 2 modèles d'inflammation initié par

les lymphocytes T CD8⁺, le modèle « classique » d'EAE ainsi que le modèle *in vitro* de la BHE humaine nous permet d'affirmer que la migration des lymphocytes T CD8⁺ au sein du SNC est dépendante de l'intégrine $\alpha 4$.

CONCLUSION

Dans cette thèse intitulée « Modulation de la réponse immunitaire dans le cerveau par la barrière hémato-encéphalique : implication en sclérose en plaques », nous avons posé comme hypothèse générale que la migration des divers sous-types de cellules immunitaires du sang périphérique à travers la BHE est contrôlée par des mécanismes moléculaires distincts et spécifiques à chaque type cellulaire. En particulier, les études présentées dans cette thèse se sont concentrées sur les mécanismes moléculaires impliqués dans la migration des monocytes et des lymphocytes T CD8⁺ ainsi que de la modulation de leur phénotype suite à la migration. Nous avons pu observer que dans le cas des monocytes, la modulation de leur phénotype est directement induite par les cellules endothéliales de la BHE, alors que dans le cas des lymphocytes T CD8⁺, c'est le caractère restrictif des cellules endothéliales qui permet un enrichissement des cellules effectrices mémoires. Grâce à nos études, nous avons pu mettre en évidence les éléments suivants :

- 1) La capacité des monocytes à se différencier en cellules dendritiques suite à leur migration à travers la BHE, permettant de démontrer pour la première fois l'origine des DCs dans le SNC. Ces DCs sont en mesure d'activer les lymphocytes T CD4⁺ en induisant un profil pro-inflammatoire de type Th1 ou Th17.
- 2) L'existence d'une nouvelle molécule d'adhérence, Ninjurin-1, qui régit spécifiquement la migration des monocytes en condition inflammatoire. Ninjurin-1 constitue la première molécule d'adhérence qui est spécifique pour un type cellulaire. L'inhibition à l'accès de Ninjurin-1 par les monocytes réduit considérablement les signes cliniques observés en EAE tout en permettant le passage au SNC des lymphocytes. Ceci est d'une importance capitale pour ne pas empêcher l'immuno-surveillance.
- 3) Le phénotype et le mécanisme moléculaire par lequel les lymphocytes T CD8⁺ atteignent le SNC qui étaient jusque-là inconnus et dont l'information manquait

pour comprendre les cas d'infection viral fatal observée chez les patients SEP traités au natalizumab. En utilisant 3 modèles animaux, le LCR de patients SEP ainsi que le modèle *in vitro* de la BHE humaine, nous démontrons que les lymphocytes T CD8⁺ EM ont des capacités accrues de migration, et que la migration des lymphocytes T CD8⁺ est directement dépendante de l'intégrine $\alpha 4$, qui constitue la cible du natalizumab. Ces données montrent pour la 1ere fois un lien entre les LEMP observés et l'inhibition d'entrée au sein du SNC des TEM.

- 4) La validité d'un traitement aux statines sur la BHE. Un des traitements les plus prometteurs en SEP en raison de sa tolérabilité et de l'absence d'effets secondaire néfaste. L'effet des statines sur la migration des lymphocytes et des monocytes ainsi que sur la perméabilité de la BHE n'avaient jusque-là pas été exploré. Cette étude a permis de démontrer que les statines permettent de réduire la migration des cellules de patients SEP à un niveau similaire à celui des contrôles, en plus de diminuer la perméabilité de la BHE, démontrant pour la première fois des effets bénéfiques des statines sur la BHE.

En conclusion, la recherche d'un traitement en SEP est toujours bien présente. Avant la venue du natalizumab, il était très peu question de savoir si un médicament pourrait affecter l'immuno-surveillance du SNC. Or aujourd'hui, nous sommes forcés de constater que c'est un paramètre d'une extrême importance. D'un autre côté, les effets bénéfiques du natalizumab nous laissent regarder l'avenir avec optimisme. La recherche se concentre maintenant sur l'identification et la caractérisation des cellules encéphalitogénique ainsi que sur les mécanismes de migration afin de trouver des traitements plus spécifiques. Nous pensons que les monocytes périphériques constituent une cible intéressante puisqu'ils sont à l'origine des poussées en EAE ainsi que du profil inflammatoire Th17 des lymphocytes T CD4⁺.

BIBLIOGRAPHIE

Abbott NJ. Evidence for bulk flow of brain interstitial fluid: significance for physiology and pathology. *Neurochem Int.* 2004 Sep;45(4):545-52.

Abbott NJ, Ronnback L, Hansson E. Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *NatRevNeurosci.* 2006;7(1):41-53.

Abbruscato TJ, Davis TP. Protein expression of brain endothelial cell E-cadherin after hypoxia/aglycemia: influence of astrocyte contact. *Brain research.* 1999 Sep 25;842(2):277-86.

Abrahamson DR. Recent studies on the structure and pathology of basement membranes. *J Pathol.* 1986 Aug;149(4):257-78.

Adamson P, Etienne S, Couraud PO, Calder V, Greenwood J. Lymphocyte migration through brain endothelial cell monolayers involves signaling through endothelial ICAM-1 via a rho-dependent pathway. *J Immunol.* 1999;162(5):2964-73.

Afonso PV, Ozden S, Prevost MC, Schmitt C, Seilhean D, Weksler B, et al. Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *J Immunol.* 2007 Aug 15;179(4):2576-83.

Agrawal S, Anderson P, Durbeej M, van Rooijen N, Ivars F, Opdenakker G, et al. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 2006 Apr 17;203(4):1007-19.

Aharoni R, Teitelbaum D, Sela M, Arnon R. Copolymer 1 induces T cells of the T helper type 2 that crossreact with myelin basic protein and suppress experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 1997 Sep 30;94(20):10821-6.

Ahmed R, Gray D. Immunological memory and protective immunity: understanding their relation. *Science*. 1996 Apr 5;272(5258):54-60.

Ahn BJ, Lee HJ, Shin MW, Choi JH, Jeong JW, Kim KW. Ninjurin1 is expressed in myeloid cells and mediates endothelium adhesion in the brains of EAE rats. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009 Sep 18;387(2):321-5.

Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM. Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nat Neurosci*. 2011 Jul 31.

Aktas O, Waiczies S, Smorodchenko A, Dorr J, Seeger B, Prozorovski T, et al. Treatment of relapsing paralysis in experimental encephalomyelitis by targeting Th1 cells through atorvastatin. *J ExpMed*. 2003;197(6):725-33.

Allegretta M, Nicklas JA, Sriram S, Albertini RJ. T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science*. 1990 Feb 9;247(4943):718-21.

Aloisi F, Ria F, Penna G, Adorini L. Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J Immunol*. 1998 May 15;160(10):4671-80.

Alonso A, Hernan MA. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: a systematic review. *Neurology*. 2008 Jul 8;71(2):129-35.

Altamura S, Muckenthaler MU. Iron toxicity in diseases of aging: Alzheimer's disease, Parkinson's disease and atherosclerosis. *J Alzheimers Dis*. 2009;16(4):879-95.

Alter A, Duddy M, Hebert S, Biernacki K, Prat A, Antel JP, et al. Determinants of human B cell migration across brain endothelial cells. *J Immunol*. 2003;170(9):4497-505.

Araki T, Milbrandt J. Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron*. 1996 Aug;17(2):353-61.

Archelos JJ, Jung S, Maurer M, Schmied M, Lassmann H, Tamatani T, et al. Inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis by an antibody to the intercellular adhesion molecule ICAM-1. *AnnNeurol*. 1993;34(2):145-54.

Arthur FE, Shivers RR, Bowman PD. Astrocyte-mediated induction of tight junctions in brain capillary endothelium: an efficient in vitro model. *Brain Res.* 1987;433(1):155-9.

Ascherio A, Munger KL. Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection. *Annals of neurology.* 2007 Apr;61(4):288-99.

Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med.* 1999 Oct 4;190(7):995-1004.

Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, 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. *JExpMed.* 2000;192(3):393-404.

Bachmann MF, Schwarz K, Wolint P, Meijerink E, Martin S, Manolova V, et al. Cutting edge: distinct roles for T help and CD40/CD40 ligand in regulating differentiation of proliferation-competent memory CD8+ T cells. *J Immunol.* 2004 Aug 15;173(4):2217-21.

Bachmann MF, Wolint P, Schwarz K, Oxenius A. Recall proliferation potential of memory CD8+ T cells and antiviral protection. *J Immunol.* 2005 Oct 1;175(7):4677-85.

Bailey-Bucktrout SL, Caulkins SC, Goings G, Fischer JA, Dzionek A, Miller SD. Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 2008 May 15;180(10):6457-61.

Bailey SL, Schreiner B, McMahon EJ, Miller SD. CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *NatImmunol.* 2007;8(2):172-80.

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

Ban M, Goris A, Lorentzen AR, Baker A, Mihalova T, Ingram G, et al. Replication analysis identifies TYK2 as a multiple sclerosis susceptibility factor. *Eur J Hum Genet.* 2009 Oct;17(10):1309-13.

Barchet W, Blasius A, Cella M, Colonna M. Plasmacytoid dendritic cells: in search of their niche in immune responses. *Immunol Res.* 2005;32(1-3):75-83.

Barker CF, Billingham RE. Immunologically privileged sites. *Adv Immunol.* 1977;25:1-54.

Barnett MH, Henderson AP, Prineas JW. The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. *Mult Scler.* 2006 Apr;12(2):121-32.

Barnett MH, Williams DB, Day S, Macaskill P, McLeod JG. Progressive increase in incidence and prevalence of multiple sclerosis in Newcastle, Australia: a 35-year study. *J Neurol Sci.* 2003 Sep 15;213(1-2):1-6.

Bebo BF, Jr., Fyfe-Johnson A, Adlard K, Beam AG, Vandebark AA, Offner H. Low-dose estrogen therapy ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis in two different inbred mouse strains. *J Immunol.* 2001 Feb 1;166(3):2080-9.

Bebo BF, Jr., Zelinka-Vincent E, Adamus G, Amundson D, Vandebark AA, Offner H. Gonadal hormones influence the immune response to PLP 139-151 and the clinical course of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 1998 Apr 15;84(2):122-30.

Becher B, Durell BG, Noelle RJ. IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2003;112(8):1186-91.

Bechmann I, Galea I, Perry VH. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 2007 Jan;28(1):5-11.

Ben-Nun A, Wekerle H, Cohen IR. The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1981 Mar;11(3):195-9.

Ben Aribia MH, Leroy E, Lantz O, Metivier D, Autran B, Charpentier B, et al. rIL 2-induced proliferation of human circulating NK cells and T lymphocytes: synergistic effects of IL 1 and IL 2. *J Immunol.* 1987 Jul 15;139(2):443-51.

Bender SJ, Weiss SR. Pathogenesis of murine coronavirus in the central nervous system. *J Neuroimmune Pharmacol.* 2010 Sep;5(3):336-54.

Benson MJ, Pino-Lagos K, Roseblatt M, Noelle RJ. All-trans retinoic acid mediates enhanced T reg cell growth, differentiation, and gut homing in the face of high levels of co-stimulation. *J Exp Med.* 2007 Aug 6;204(8):1765-74.

Berger JR. Progressive Multifocal Leukoencephalopathy. *CurrTreatOptionsNeurol.* 2000;2(4):361-8.

Bergmann CC, Lane TE, Stohlman SA. Coronavirus infection of the central nervous system: host-virus stand-off. *NatRevMicrobiol.* 2006;4(2):121-32.

Berlin C, Bargatze RF, Campbell JJ, von Andrian UH, Szabo MC, Hasslen SR, et al. alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow. *Cell.* 1995;80(3):413-22.

Bettini M, Rosenthal K, Evavold BD. Pathogenic MOG-reactive CD8+ T cells require MOG-reactive CD4+ T cells for sustained CNS inflammation during chronic EAE. *J Neuroimmunol.* 2009 Aug 18;213(1-2):60-8.

Bich-Thuy LT, Dukovich M, Peffer NJ, Fauci AS, Kehrl JH, Greene WC. Direct activation of human resting T cells by IL 2: the role of an IL 2 receptor distinct from the Tac protein. *J Immunol.* 1987 Sep 1;139(5):1550-6.

Biernacki K, Prat A, Blain M, Antel JP. Regulation of cellular and molecular trafficking across human brain endothelial cells by Th1- and Th2-polarized lymphocytes. *J NeuropatholExpNeurol.* 2004;63(3):223-32.

Biernacki K, Prat A, Blain M, Antel JP. Regulation of Th1 and Th2 lymphocyte migration by human adult brain endothelial cells. *J NeuropatholExpNeurol.* 2001;60(12):1127-36.

Bo L, Vedeler CA, Nyland HI, Trapp BD, Mork SJ. Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *J Neuropathol Exp Neurol.* 2003 Jul;62(7):723-32.

Boonstra A, Barrat FJ, Crain C, Heath VL, Savelkoul HF, O'Garra A. 1alpha,25-Dihydroxyvitamin d3 has a direct effect on naive CD4(+) T cells to enhance the development of Th2 cells. *J Immunol*. 2001 Nov 1;167(9):4974-80.

Booss J, Esiri MM, Tourtellotte WW, Mason DY. Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis. *JNeuroSci*. 1983;62(1-3):219-32.

Brabb T, von Dassow P, Ordonez N, Schnabel B, Duke B, Goverman J. In situ tolerance within the central nervous system as a mechanism for preventing autoimmunity. *J Exp Med*. 2000 Sep 18;192(6):871-80.

Brightman MW, Reese TS. Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain. *The Journal of cell biology*. 1969 Mar;40(3):648-77.

Broman T. Blood-Brain Barrier Damage in Multiple Sclerosis Supravital Test-Observations. *Acta Neurol Scand Suppl*. 1964;40:SUPPL 10:21-4.

Bronnum-Hansen H, Koch-Henriksen N, Stenager E. Trends in survival and cause of death in Danish patients with multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 2004 Apr;127(Pt 4):844-50.

Bronstein JM, Tiwari-Woodruff S, Buznikov AG, Stevens DB. Involvement of OSP/claudin-11 in oligodendrocyte membrane interactions: role in biology and disease. *J Neurosci Res*. 2000 Mar 15;59(6):706-11.

Brown AM, McFarlin DE. Relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the SJL/J mouse. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*. 1981 Sep;45(3):278-84.

Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, Yasayko SA, et al. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat Genet*. 2001 Jan;27(1):68-73.

Brynedal B, Duvefelt K, Jonasdottir G, Roos IM, Akesson E, Palmgren J, et al. HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS One*. 2007;2(7):e664.

Burton JM, Alikhani K, Goyal M, Costello F, White C, Patry D, et al. Complications in MS Patients after CCSVI Procedures Abroad (Calgary, AB). *Can J Neurol Sci.* 2011 Sep;38(5):741-6.

Butcher EC, Picker LJ. Lymphocyte homing and homeostasis. *Science.* 1996 Apr 5;272(5258):60-6.

Cabarrocas J, Bauer J, Piaggio E, Liblau R, Lassmann H. Effective and selective immune surveillance of the brain by MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur J Immunol.* 2003;33(5):1174-82.

Calabresi PA, Prat A, Biernacki K, Rollins J, Antel JP. T lymphocytes conditioned with Interferon beta induce membrane and soluble VCAM on human brain endothelial cells. *J Neuroimmunol.* 2001;115(1-2):161-7.

Calabro P, Yeh ET. The pleiotropic effects of statins. *Curr Opin Cardiol.* 2005 Nov;20(6):541-6.

Cao X, Cai SF, Fehniger TA, Song J, Collins LI, Piwnica-Worms DR, et al. Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance. *Immunity.* 2007;27(4):635-46.

Carman CV. Mechanisms for transcellular diapedesis: probing and pathfinding by 'invadosome-like protrusions'. *Journal of cell science.* 2009 Sep 1;122(Pt 17):3025-35.

Carman CV, Springer TA. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol.* 2004;167(2):377-88.

Carman CV, Springer TA. Trans-cellular migration: cell-cell contacts get intimate. *Curr Opin Cell Biol.* 2008.

Caux C, Massacrier C, Dubois B, Valladeau J, Dezutter-Dambuyant C, Durand I, et al. Respective involvement of TGF-beta and IL-4 in the development of Langerhans cells and non-Langerhans dendritic cells from CD34+ progenitors. *J Leukoc Biol.* 1999;66(5):781-91.

Cayrol R, Haqqani AS, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Prat A. Isolation of human brain endothelial cells and characterization of lipid raft-associated proteins by mass spectroscopy. *Methods Mol Biol.* 2011;686:275-95.

Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol.* 2008;9(2):137-45.

Cermelli C, Berti R, Soldan SS, Mayne M, D'Ambrosia J M, Ludwin SK, et al. High frequency of human herpesvirus 6 DNA in multiple sclerosis plaques isolated by laser microdissection. *J Infect Dis.* 2003 May 1;187(9):1377-87.

Charcot J. Histologie de la sclérose en plaque. *Gazette des Hôpitaux.* 1868a;41:554-66.

Charcot J. Comptes rendus des séances et mémoires lus à la société de Biologie. 1868b.

Chard DT, Dalton CM, Swanton J, Fisniku LK, Miszkief KA, Thompson AJ, et al. MRI only conversion to multiple sclerosis following a clinically isolated syndrome. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011 Feb;82(2):176-9.

Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei KJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med.* 2003 Dec 15;198(12):1875-86.

Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, et al. Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest.* 2006;116(5):1317-26.

Choi EY, Santoso S, Chavakis T. Mechanisms of neutrophil transendothelial migration. *Front Biosci.* 2009;14:1596-605.

Chomarat P, Banchereau J, Davoust J, Palucka AK. IL-6 switches the differentiation of monocytes from dendritic cells to macrophages. *Nat Immunol.* 2000;1(6):510-4.

Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, et al. RORgamma^t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the

effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nature Immunology*. 2011 Jun;12(6):560-7.

Coles AJ, Fox E, Vladic A, Gazda SK, Brinar V, Selmaj KW, et al. Alemtuzumab versus interferon beta-1a in early relapsing-remitting multiple sclerosis: post-hoc and subset analyses of clinical efficacy outcomes. *Lancet Neurol*. 2011 Apr;10(4):338-48.

Collison LW, Workman CJ, Kuo TT, Boyd K, Wang Y, Vignali KM, et al. The inhibitory cytokine IL-35 contributes to regulatory T-cell function. *Nature*. 2007;450(7169):566-9.

Colonna M, Trinchieri G, Liu YJ. Plasmacytoid dendritic cells in immunity. *Nature Immunology*. 2004 Dec;5(12):1219-26.

Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2002 Apr 6;359(9313):1221-31.

Confavreux C, Hutchinson M, Hours MM, Cortinovis-Tourniaire P, Moreau T. Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group. *N Engl J Med*. 1998 Jul 30;339(5):285-91.

Correale J, Arias M, Gilmore W. Steroid hormone regulation of cytokine secretion by proteolipid protein-specific CD4+ T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol*. 1998 Oct 1;161(7):3365-74.

Cottrell DA, Kremenchtzky M, Rice GP, Koopman WJ, Hader W, Baskerville J, et al. The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 5. The clinical features and natural history of primary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 1999 Apr;122 (Pt 4):625-39.

Craelius W, Migdal MW, Luessenhop CP, Sugar A, Mihalakis I. Iron deposits surrounding multiple sclerosis plaques. *Arch Pathol Lab Med*. 1982 Aug;106(8):397-9.

Crispin JC, Tsokos GC. Interleukin-17-producing T cells in lupus. *Curr Opin Rheumatol*. 2010 Sep;22(5):499-503.

Cross AH, Trotter JL, Lyons J. B cells and antibodies in CNS demyelinating disease. *J Neuroimmunol*. 2001 Jan 1;112(1-2):1-14.

Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, et al. Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature*. 2003;421(6924):744-8.

Curotto de Lafaille MA, Lafaille JJ. Natural and adaptive foxp3⁺ regulatory T cells: more of the same or a division of labor? *Immunity*. 2009 May;30(5):626-35.

Dales SaA, R. Pathogenesis and Disease of the Central Nervous System Caused by Murine Coronaviruses. In: Siddell SG, editor. *The Coronaviridae*. New York: Plenum Press; 1995. p. 257-82.

De Jager PL, Jia X, Wang J, de Bakker PI, Ottoboni L, Aggarwal NT, et al. Meta-analysis of genome scans and replication identify CD6, IRF8 and TNFRSF1A as new multiple sclerosis susceptibility loci. *NatGenet*. 2009;41(7):776-82.

de Lange EC. Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier. *Adv Drug Deliv Rev*. 2004 Oct 14;56(12):1793-809.

Dean G, Elian M. Age at immigration to England of Asian and Caribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1997 Nov;63(5):565-8.

Dehouck MP, Meresse S, Delorme P, Fruchart JC, Cecchelli R. An easier, reproducible, and mass-production method to study the blood-brain barrier in vitro. *J Neurochem*. 1990 May;54(5):1798-801.

del Zoppo GJ, Milner R. Integrin-matrix interactions in the cerebral microvasculature. *ArteriosclerThrombVascBiol*. 2006;26(9):1966-75.

Di Cesare A, Di Meglio P, Nestle FO. The IL-23/Th17 axis in the immunopathogenesis of psoriasis. *J Invest Dermatol*. 2009 Jun;129(6):1339-50.

Doepf F, Paul F, Valdueza JM, Schmierer K, Schreiber SJ. No cerebrocervical venous congestion in patients with multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2010 Aug;68(2):173-83.

Dong X, Bachman LA, Kumar R, Griffin MD. Generation of antigen-specific, interleukin-10-producing T-cells using dendritic cell stimulation and steroid hormone conditioning. *Transpl Immunol*. 2003 Jul-Sep;11(3-4):323-33.

Doring A, Pfeiffer F, Meier M, Dehouck B, Tauber S, Deutsch U, et al. TET inducible expression of the alpha4beta7-integrin ligand MAdCAM-1 on the blood-brain barrier does not influence the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol*. 2011 Mar;41(3):813-21.

Dreyfus CF, Dai X, Lercher LD, Racey BR, Friedman WJ, Black IB. Expression of neurotrophins in the adult spinal cord in vivo. *J Neurosci Res*. 1999 Apr 1;56(1):1-7.

Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Schmitz JE, Zheng Y, Martin K, Peyerl FW, et al. Low frequency of cytotoxic T lymphocytes against the novel HLA-A*0201-restricted JC virus epitope VP1(p36) in patients with proven or possible progressive multifocal leukoencephalopathy. *J Virol*. 2003;77(22):11918-26.

Du Pasquier RA, Schmitz JE, Jean-Jacques J, Zheng Y, Gordon J, Khalili K, et al. Detection of JC virus-specific cytotoxic T lymphocytes in healthy individuals. *J Virol*. 2004;78(18):10206-10.

Duddy M, Niino M, Adatia F, Hebert S, Freedman M, Atkins H, et al. Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J Immunol*. 2007 May 15;178(10):6092-9.

Duong TT, St Louis J, Gilbert JJ, Finkelman FD, Strejan GH. Effect of anti-interferon-gamma and anti-interleukin-2 monoclonal antibody treatment on the development of actively and passively induced experimental allergic encephalomyelitis in the SJL/J mouse. *J Neuroimmunol*. 1992 Feb;36(2-3):105-15.

Dyment DA, Ebers GC, Sadovnick AD. Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol*. 2004 Feb;3(2):104-10.

Ebers GC, Kukay K, Bulman DE, Sadovnick AD, Rice G, Anderson C, et al. A full genome search in multiple sclerosis. *NatGenet*. 1996;13(4):472-6.

Ebers GC, Vinuela FV, Feasby T, Bass B. Multifocal CT enhancement in MS. *Neurology*. 1984 Mar;34(3):341-6.

Ehling R, Berger T, Reindl M. Multiple sclerosis - established and novel therapeutic approaches. *Cent Nerv Syst Agents Med Chem*. 2010 Mar;10(1):3-15.

Ehrlich P. Das sauerstoffbedürfnis des organismus. Eine Farbenanalytische Studie. Hirschwald, Berlin; 1885.

Ehrlich P. Ueber die beziehungen von chemischer constitution, verteilung und pharmakologischer wirkung. Gesammelte Arbeiten zur Immunitätsforschung. Hirschwald, Berlin; 1904.

Elhogy A, Depaolo RW, Lira SA, Lukacs NW, Karpus WJ. Mice deficient for CCR6 fail to control chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 2009 Aug 18;213(1-2):91-9.

Elian M, Nightingale S, Dean G. Multiple sclerosis among United Kingdom-born children of immigrants from the Indian subcontinent, Africa and the West Indies. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*. 1990 Oct;53(10):906-11.

Ellis R, Boggild M. Therapy-related acute leukaemia with Mitoxantrone: what is the risk and can we minimise it? *Mult Scler*. 2009 Apr;15(4):505-8.

Emamaullee JA, Davis J, Merani S, Toso C, Elliott JF, Thiesen A, et al. Inhibition of Th17 cells regulates autoimmune diabetes in NOD mice. *Diabetes*. 2009 Jun;58(6):1302-11.

Engelhardt B. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm*. 2006;113(4):477-85.

Engelhardt B, Kappos L. Natalizumab: targeting alpha4-integrins in multiple sclerosis. *NeurodegenerDis*. 2008;5(1):16-22.

Engelhardt B, Laschinger M, Schulz M, Samulowitz U, Vestweber D, Hoch G. The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires alpha4-integrin but not alpha4beta7-integrin. *J Clin Invest*. 1998;102(12):2096-105.

Engelhardt B, Ransohoff RM. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol*. 2005;26(9):485-95.

Engelhardt B, Sorokin L. The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin Immunopathol.* 2009 Nov;31(4):497-511.

Fabrick BO, van Haastert ES, Galea I, Polfliet MM, Dopp ED, Van Den Heuvel MM, et al. CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation. *Glia.* 2005;51(4):297-305.

Fabry Z, Topham DJ, Fee D, Herlein J, Carlino JA, Hart MN, et al. TGF-beta 2 decreases migration of lymphocytes in vitro and homing of cells into the central nervous system in vivo. *J Immunol.* 1995 Jul 1;155(1):325-32.

Fainardi E, Castellazzi M, Bellini T, Manfrinato MC, Baldi E, Casetta I, et al. Cerebrospinal fluid and serum levels and intrathecal production of active matrix metalloproteinase-9 (MMP-9) as markers of disease activity in patients with multiple sclerosis. *Mult Scler.* 2006 Jun;12(3):294-301.

Fenstermacher J, Gross P, Sposito N, Acuff V, Pettersen S, Gruber K. Structural and functional variations in capillary systems within the brain. *Ann N Y Acad Sci.* 1988;529:21-30.

Fogdell-Hahn A, Ligiers A, Gronning M, Hillert J, Olerup O. Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens.* 2000 Feb;55(2):140-8.

Forster C, Burek M, Romero IA, Weksler B, Couraud PO, Drenckhahn D. Differential effects of hydrocortisone and TNFalpha on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *The Journal of physiology.* 2008 Apr 1;586(7):1937-49.

Friese MA, Fugger L. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *AnnNeurol.* 2009;66(2):132-41.

Friese MA, Fugger L. Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain.* 2005;128(Pt 8):1747-63.

Fritz RB, Chou CH, McFarlin DE. Relapsing murine experimental allergic encephalomyelitis induced by myelin basic protein. *J Immunol.* 1983 Mar;130(3):1024-6.

- Fruh K, Yang Y. Antigen presentation by MHC class I and its regulation by interferon gamma. *Curr Opin Immunol*. 1999 Feb;11(1):76-81.
- Geissmann F, Manz MG, Jung S, Sieweke MH, Merad M, Ley K. Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science*. 2010 Feb 5;327(5966):656-61.
- Gilmore W, Weiner LP, Correale J. Effect of estradiol on cytokine secretion by proteolipid protein-specific T cell clones isolated from multiple sclerosis patients and normal control subjects. *J Immunol*. 1997 Jan 1;158(1):446-51.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M, Nandi S, See P, Gokhan S, et al. Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science*. 2010 Nov 5;330(6005):841-5.
- Ginhoux F, Tacke F, Angeli V, Bogunovic M, Loubeau M, Dai XM, et al. Langerhans cells arise from monocytes in vivo. *Nat Immunol*. 2006;7(3):265-73.
- Godfrey VL, Wilkinson JE, Russell LB. X-linked lymphoreticular disease in the scurfy (sf) mutant mouse. *Am J Pathol*. 1991 Jun;138(6):1379-87.
- Goldmann E. Vitalfärbung am zentralnervensystem. *Abhandl Konigl preuss Akad Wiss*. 1913;1:1-60.
- Goldstein GW, Betz AL. The blood-brain barrier. *Scientific American*. 1986 Sep;255(3):74-83.
- Gondek DC, Lu LF, Quezada SA, Sakaguchi S, Noelle RJ. Cutting edge: contact-mediated suppression by CD4+CD25+ regulatory cells involves a granzyme B-dependent, perforin-independent mechanism. *J Immunol*. 2005;174(4):1783-6.
- Gonlugur U, Efeoglu T. Vascular adhesion and transendothelial migration of eosinophil leukocytes. *Cell Tissue Res*. 2004;318(3):473-82.
- Gordon EJ, Myers KJ, Dougherty JP, Rosen H, Ron Y. Both anti-CD11a (LFA-1) and anti-CD11b (MAC-1) therapy delay the onset and diminish the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1995 Nov;62(2):153-60.

Goverman J. Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 2009 Jun;9(6):393-407.

Greenwood J, Wang Y, Calder VL. Lymphocyte adhesion and transendothelial migration in the central nervous system: the role of LFA-1, ICAM-1, VLA-4 and VCAM-1. *off. Immunology.* 1995;86(3):408-15.

Gregersen JW, Kranc KR, Ke X, Svendsen P, Madsen LS, Thomsen AR, et al. Functional epistasis on a common MHC haplotype associated with multiple sclerosis. *Nature.* 2006 Oct 5;443(7111):574-7.

Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, et al. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *NatMed.* 2005;11(3):328-34.

Grieb P, Forster RE, Strome D, Goodwin CW, Pape PC. O₂ exchange between blood and brain tissues studied with ¹⁸O₂ indicator-dilution technique. *J Appl Physiol.* 1985 Jun;58(6):1929-41.

Griffith TS, Brunner T, Fletcher SM, Green DR, Ferguson TA. Fas ligand-induced apoptosis as a mechanism of immune privilege. *Science.* 1995 Nov 17;270(5239):1189-92.

Group PPoRaDbIb-aSiMSS. Randomised double-blind placebo-controlled study of interferon beta-1a in relapsing/remitting multiple sclerosis. PRISMS (Prevention of Relapses and Disability by Interferon beta-1a Subcutaneously in Multiple Sclerosis) Study Group. *Lancet.* 1998;352(9139):1498-504.

Gruslin E, Moisan S, St-Pierre Y, Desforges M, Talbot PJ. Transcriptome profile within the mouse central nervous system and activation of myelin-reactive T cells following murine coronavirus infection. *JNeuroimmunol.* 2005;162(1-2):60-70.

Gunn MD, Kyuwa S, Tam C, Kakiuchi T, Matsuzawa A, Williams LT, et al. Mice lacking expression of secondary lymphoid organ chemokine have defects in lymphocyte homing and dendritic cell localization. *J Exp Med.* 1999 Feb 1;189(3):451-60.

Hafler DA, Compston A, Sawcer S, Lander ES, Daly MJ, De Jager PL, et al. Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *NEnglJMed.* 2007;357(9):851-62.

Haines JL, Ter-Minassian M, Bazyk A, Gusella JF, Kim DJ, Terwedow H, et al. A complete genomic screen for multiple sclerosis underscores a role for the major histocompatibility complex. The Multiple Sclerosis Genetics Group. *NatGenet.* 1996;13(4):469-71.

Harbo HF, Lie BA, Sawcer S, Celius EG, Dai KZ, Oturai A, et al. Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue Antigens.* 2004 Mar;63(3):237-47.

Harding FA, McArthur JG, Gross JA, Raulet DH, Allison JP. CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature.* 1992 Apr 16;356(6370):607-9.

Harp CT, Ireland S, Davis LS, Remington G, Cassidy B, Cravens PD, et al. Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN-gamma production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol.* 2010 Oct;40(10):2942-56.

Hart DN, Fabre JW. Demonstration and characterization of Ia-positive dendritic cells in the interstitial connective tissues of rat heart and other tissues, but not brain. *J Exp Med.* 1981 Aug 1;154(2):347-61.

Hartung HP, Gonsette R, König N, Kwiecinski H, Guseo A, Morrissey SP, et al. Mitoxantrone in progressive multiple sclerosis: a placebo-controlled, double-blind, randomised, multicentre trial. *Lancet.* 2002 Dec 21-28;360(9350):2018-25.

Harty JT, Tvinnereim AR, White DW. CD8+ T cell effector mechanisms in resistance to infection. *Annu Rev Immunol.* 2000;18:275-308.

Hatterer E, Davoust N, Didier-Bazes M, Vuaillet C, Malcus C, Belin MF, et al. How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood.* 2006 Jan 15;107(2):806-12.

Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL. Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *AnnNeurol.* 1986;19(6):578-87.

Hauser SL, Waubant E, Arnold DL, Vollmer T, Antel J, Fox RJ, et al. B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2008 Feb 14;358(7):676-88.

Hawkins BT, Davis TP. The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *PharmacolRev*. 2005;57(2):173-85.

Hayashi T, Morimoto C, Burks JS, Kerr C, Hauser SL. Dual-label immunocytochemistry of the active multiple sclerosis lesion: major histocompatibility complex and activation antigens. *AnnNeurol*. 1988;24(4):523-31.

He F, Sun YE. Glial cells more than support cells? *Int J Biochem Cell Biol*. 2007;39(4):661-5.

Hendriks JJ, Teunissen CE, de Vries HE, Dijkstra CD. Macrophages and neurodegeneration. *Brain research Brain research reviews*. 2005 Apr;48(2):185-95.

Heppner FL, Greter M, Marino D, Falsig J, Raivich G, Hovelmeyer N, et al. Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *NatMed*. 2005;11(2):146-52.

Hosking MP, Lane TE. The Biology of Persistent Infection: Inflammation and Demyelination following Murine Coronavirus Infection of the Central Nervous System. *CurrImmunolRev*. 2009;5(4):267-76.

Houtman JJ, Fleming JO. Dissociation of demyelination and viral clearance in congenitally immunodeficient mice infected with murine coronavirus JHM. *J Neurovirol*. 1996 Apr;2(2):101-10.

Huitinga I, van Rooijen N, de Groot CJ, Uitdehaag BM, Dijkstra CD. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages. *J Exp Med*. 1990 Oct 1;172(4):1025-33.

Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *JExpMed*. 2001;194(5):669-76.

Huster KM, Stemberger C, Busch DH. Protective immunity towards intracellular pathogens. *Curr Opin Immunol*. 2006 Aug;18(4):458-64.

Ifergan I, Kebir H, Bernard M, Wosik K, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, et al. The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells. *Brain*. 2008;131(Pt 3):785-99.

Ifergan I, Wosik K, Cayrol R, Kebir H, Auger C, Bernard M, et al. Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: relevance to multiple sclerosis. *AnnNeurol*. 2006;60(1):45-55.

Irla M, Kupfer N, Suter T, Lissilaa R, Benkhoucha M, Skupsky J, et al. MHC class II-restricted antigen presentation by plasmacytoid dendritic cells inhibits T cell-mediated autoimmunity. *J Exp Med*. 2010 Aug 30;207(9):1891-905.

Jacobs LD, Cookfair DL, Rudick RA, Herndon RM, Richert JR, Salazar AM, et al. Intramuscular interferon beta-1a for disease progression in relapsing multiple sclerosis. The Multiple Sclerosis Collaborative Research Group (MSCRG). *Annals of neurology*. 1996 Mar;39(3):285-94.

Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, et al. Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain : a journal of neurology*. 2002 Mar;125(Pt 3):538-50.

Janssen EM, Lemmens EE, Wolfe T, Christen U, von Herrath MG, Schoenberger SP. CD4+ T cells are required for secondary expansion and memory in CD8+ T lymphocytes. *Nature*. 2003 Feb 20;421(6925):852-6.

Jansson L, Olsson T, Holmdahl R. Estrogen induces a potent suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis and collagen-induced arthritis in mice. *J Neuroimmunol*. 1994 Sep;53(2):203-7.

Jiang H, Braunstein NS, Yu B, Winchester R, Chess L. CD8+ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+ T cells in EAE mice. *ProcNatlAcadSciUSA*. 2001;98(11):6301-6.

Jiang H, Curran S, Ruiz-Vazquez E, Liang B, Winchester R, Chess L. Regulatory CD8+ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V beta repertoire during

experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA*. 2003;100(14):8378-83.

Jiang H, Zhang SI, Pernis B. Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis. *Science*. 1992;256(5060):1213-5.

Jingwu Z, Medaer R, Hashim GA, Chin Y, van den Berg-Loonen E, Raus JC. Myelin basic protein-specific T lymphocytes in multiple sclerosis and controls: precursor frequency, fine specificity, and cytotoxicity. *Annals of neurology*. 1992 Sep;32(3):330-8.

Johnson KP, Brooks BR, Cohen JA, Ford CC, Goldstein J, Lisak RP, et al. Copolymer 1 reduces relapse rate and improves disability in relapsing-remitting multiple sclerosis: results of a phase III multicenter, double-blind placebo-controlled trial. The Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Neurology*. 1995 Jul;45(7):1268-76.

Jung S, Huitinga I, Schmidt B, Zielasek J, Dijkstra CD, Toyka KV, et al. Selective elimination of macrophages by dichloromethylene diphosphonate-containing liposomes suppresses experimental autoimmune neuritis. *J Neurol Sci*. 1993 Nov;119(2):195-202.

Kabat EA, Glusman M, Knaub V. Quantitative estimation of the albumin and gamma globulin in normal and pathologic cerebrospinal fluid by immunochemical methods. *Am J Med*. 1948 May;4(5):653-62.

Kaech SM, Wherry EJ, Ahmed R. Effector and memory T-cell differentiation: implications for vaccine development. *Nat Rev Immunol*. 2002;2(4):251-62.

Kalia V, Sarkar S, Gourley TS, Rouse BT, Ahmed R. Differentiation of memory B and T cells. *Curr Opin Immunol*. 2006 Jun;18(3):255-64.

Kallen J, Welzenbach K, Ramage P, Geyl D, Kriwacki R, Legge G, et al. Structural basis for LFA-1 inhibition upon lovastatin binding to the CD11a I-domain. *J Mol Biol*. 1999 Sep 10;292(1):1-9.

Kang J, Jiang L, Goldman SA, Nedergaard M. Astrocyte-mediated potentiation of inhibitory synaptic transmission. *Nat Neurosci*. 1998 Dec;1(8):683-92.

Kappos L, Antel J, Comi G, Montalban X, O'Connor P, Polman CH, et al. Oral fingolimod (FTY720) for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2006 Sep 14;355(11):1124-40.

Katsifis GE, Rekka S, Moutsopoulos NM, Pillemer S, Wahl SM. Systemic and local interleukin-17 and linked cytokines associated with Sjogren's syndrome immunopathogenesis. *Am J Pathol*. 2009 Sep;175(3):1167-77.

Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing T H 17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol*. 2009;66(3):390-402.

Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, et al. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med*. 2007;13(10):1173-5.

Kerlero de Rosbo N, Hoffman M, Mendel I, Yust I, Kaye J, Bakimer R, et al. Predominance of the autoimmune response to myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in multiple sclerosis: reactivity to the extracellular domain of MOG is directed against three main regions. *Eur J Immunol*. 1997 Nov;27(11):3059-69.

Kermode AG, Thompson AJ, Tofts P, MacManus DG, Kendall BE, Kingsley DP, et al. Breakdown of the blood-brain barrier precedes symptoms and other MRI signs of new lesions in multiple sclerosis. Pathogenetic and clinical implications. *Brain : a journal of neurology*. 1990 Oct;113 (Pt 5):1477-89.

Khan O, Filippi M, Freedman MS, Barkhof F, Dore-Duffy P, Lassmann H, et al. Chronic cerebrospinal venous insufficiency and multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2010 Mar;67(3):286-90.

Kim JH, Park JA, Lee SW, Kim WJ, Yu YS, Kim KW. Blood-neural barrier: intercellular communication at glio-vascular interface. *J Biochem Mol Biol*. 2006 Jul 31;39(4):339-45.

Kim S, Liva SM, Dalal MA, Verity MA, Voskuhl RR. Estriol ameliorates autoimmune demyelinating disease: implications for multiple sclerosis. *Neurology*. 1999 Apr 12;52(6):1230-8.

King IL, Dickendesher TL, Segal BM. Circulating Ly-6C⁺ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood*. 2009 Apr 2;113(14):3190-7.

Kirk J, Plumb J, Mirakhur M, McQuaid S. Tight junctional abnormality in multiple sclerosis white matter affects all calibres of vessel and is associated with blood-brain barrier leakage and active demyelination. *J Pathol*. 2003;201(2):319-27.

Kleinschmidt-DeMasters BK, Tyler KL. Progressive multifocal leukoencephalopathy complicating treatment with natalizumab and interferon beta-1a for multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2005;353(4):369-74.

Kniesel U, Wolburg H. Tight junctions of the blood-brain barrier. *Cell Mol Neurobiol*. 2000;20(1):57-76.

Koh DR, Fung-Leung WP, Ho A, Gray D, Cha-Orbea H, Mak TW. Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice. *Science*. 1992;256(5060):1210-3.

Komiyama Y, Nakae S, Matsuki T, Nambu A, Ishigame H, Kakuta S, et al. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006;177(1):566-73.

Koralnik IJ, Du Pasquier RA, Kuroda MJ, Schmitz JE, Dang X, Zheng Y, et al. Association of prolonged survival in HLA-A2⁺ progressive multifocal leukoencephalopathy patients with a CTL response specific for a commonly recognized JC virus epitope. *J Immunol*. 2002;168(1):499-504.

Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM. IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med*. 2008;205(7):1535-41.

Krogias C, Schroder A, Wiendl H, Hohlfeld R, Gold R. ["Chronic cerebrospinal venous insufficiency" and multiple sclerosis: critical analysis and first observation in an unselected cohort of MS patients]. *Nervenarzt*. 2010 Jun;81(6):740-6.

Kubes P, Ward PA. Leukocyte recruitment and the acute inflammatory response. *Brain Pathol*. 2000;10(1):127-35.

Kurschus FC, Bruno R, Fellows E, Falk CS, Jenne DE. Membrane receptors are not required to deliver granzyme B during killer cell attack. *Blood*. 2005 Mar 1;105(5):2049-58.

Kurtzke JF. Multiple sclerosis in time and space--geographic clues to cause. *J Neurovirol*. 2000 May;6 Suppl 2:S134-40.

Lalive PH, Neuhaus O, Benkhoucha M, Burger D, Hohlfeld R, Zamvil SS, et al. Glatiramer acetate in the treatment of multiple sclerosis: emerging concepts regarding its mechanism of action. *CNS Drugs*. 2011 May 1;25(5):401-14.

Lambert C, Desbarats J, Arbour N, Hall JA, Olivier A, Bar-Or A, et al. Dendritic cell differentiation signals induce anti-inflammatory properties in human adult microglia. *J Immunol*. 2008 Dec 15;181(12):8288-97.

Lane TE, Buchmeier MJ. Murine coronavirus infection: a paradigm for virus-induced demyelinating disease. *Trends Microbiol*. 1997 Jan;5(1):9-14.

Langer-Gould A, Atlas SW, Green AJ, Bollen AW, Pelletier D. Progressive multifocal leukoencephalopathy in a patient treated with natalizumab. *NEnglJMed*. 2005;353(4):375-81.

Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, et al. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J ExpMed*. 2005;201(2):233-40.

Lassmann H, Bruck W, Lucchinetti CF. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain Pathol*. 2007 Apr;17(2):210-8.

Lee SW, Kim WJ, Choi YK, Song HS, Son MJ, Gelman IH, et al. SSeCKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier. *NatMed*. 2003;9(7):900-6.

Lee YH, Ishida Y, Rifa'i M, Shi Z, Isobe K, Suzuki H. Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2008 Jan 15;180(2):825-32.

Leech S, Kirk J, Plumb J, McQuaid S. Persistent endothelial abnormalities and blood-brain barrier leak in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *NeuropatholApplNeurobiol*. 2007;33(1):86-98.

Leppert D, Ford J, Stabler G, Grygar C, Lienert C, Huber S, et al. Matrix metalloproteinase-9 (gelatinase B) is selectively elevated in CSF during relapses and stable phases of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. 1998 Dec;121 (Pt 12):2327-34.

Levine SM, Chakrabarty A. The role of iron in the pathogenesis of experimental allergic encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 2004 Mar;1012:252-66.

Ley K, Laudanna C, Cybulsky MI, Nourshargh S. Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *NatRev Immunol*. 2007;7(9):678-89.

Li XL, Dou YC, Liu Y, Shi CW, Cao LL, Zhang XQ, et al. Atorvastatin ameliorates experimental autoimmune neuritis by decreased Th1/Th17 cytokines and up-regulated T regulatory cells. *Cell Immunol*. 2011 Aug 23.

Liedtke W, Edelmann W, Bieri PL, Chiu FC, Cowan NJ, Kucherlapati R, et al. GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron*. 1996 Oct;17(4):607-15.

Lincoln MR, Montpetit A, Cader MZ, Saarela J, Dymont DA, Tiislar M, et al. A predominant role for the HLA class II region in the association of the MHC region with multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2005 Oct;37(10):1108-12.

Ling C, Sandor M, Fabry Z. In situ processing and distribution of intracerebrally injected OVA in the CNS. *J Neuroimmunol*. 2003 Aug;141(1-2):90-8.

Linker RA, Rott E, Hofstetter HH, Hanke T, Toyka KV, Gold R. EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses. *NeurobiolDis*. 2005;19(1-2):218-28.

Linthicum DS, Frelinger JA. Acute autoimmune encephalomyelitis in mice. II. Susceptibility is controlled by the combination of H-2 and histamine sensitization genes. *J Exp Med*. 1982 Jul 1;156(1):31-40.

Lobell A, Weissert R, Storch MK, Svanholm C, de Graaf KL, Lassmann H, et al. Vaccination with DNA encoding an immunodominant myelin basic protein peptide targeted to Fc of immunoglobulin G suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 1998 May 4;187(9):1543-8.

Lublin FD, Reingold SC. Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*. 1996 Apr;46(4):907-11.

Lucchinetti C, Bruck W, Parisi J, Scheithauer B, Rodriguez M, Lassmann H. Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann Neurol*. 2000;47(6):707-17.

Lundmark F, Duvefelt K, Iacobaeus E, Kockum I, Wallstrom E, Khademi M, et al. Variation in interleukin 7 receptor alpha chain (IL7R) influences risk of multiple sclerosis. *Nat Genet*. 2007;39(9):1108-13.

Luster AD, Alon R, von Andrian UH. Immune cell migration in inflammation: present and future therapeutic targets. *Nat Immunol*. 2005;6(12):1182-90.

Mahad D, Callahan MK, Williams KA, Ubogu EE, Kivisakk P, Tucky B, et al. Modulating CCR2 and CCL2 at the blood-brain barrier: relevance for multiple sclerosis pathogenesis. *Brain*. 2006;129(Pt 1):212-23.

Malek TR, Yu A, Zhu L, Matsutani T, Adeegbe D, Bayer AL. IL-2 family of cytokines in T regulatory cell development and homeostasis. *J Clin Immunol*. 2008 Nov;28(6):635-9.

Mandarino LJ, Sundarraj N, Finlayson J, Hassell HR. Regulation of fibronectin and laminin synthesis by retinal capillary endothelial cells and pericytes in vitro. *Exp Eye Res*. 1993 Nov;57(5):609-21.

Martinelli V, Radaelli M, Straffi L, Rodegher M, Comi G. Mitoxantrone: benefits and risks in multiple sclerosis patients. *Neurol Sci*. 2009 Oct;30 Suppl 2:S167-70.

Martino G, Pluchino S. The therapeutic potential of neural stem cells. *Nat Rev Neurosci*. 2006 May;7(5):395-406.

Marzocchetti A, Tompkins T, Clifford DB, Gandhi RT, Kesari S, Berger JR, et al. Determinants of survival in progressive multifocal leukoencephalopathy. *Neurology*. 2009;73(19):1551-8.

Matsushita T, Yanaba K, Bouaziz JD, Fujimoto M, Tedder TF. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *The Journal of clinical investigation*. 2008 Oct;118(10):3420-30.

Mazzetti S, Frigerio S, Gelati M, Salmaggi A, Vitellaro-Zuccarello L. Lycopersicon esculentum lectin: an effective and versatile endothelial marker of normal and tumoral blood vessels in the central nervous system. *EurJHistochem*. 2004;48(4):423-8.

McDonald WI, Compston A, Edan G, Goodkin D, Hartung HP, Lublin FD, et al. Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *AnnNeurol*. 2001;50(1):121-7.

McEver RP, Zhu C. Rolling cell adhesion. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 2010 Nov 10;26:363-96.

McFarland HF. Correlation between MR and clinical findings of disease activity in multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol*. 1999 Nov-Dec;20(10):1777-8.

McFarland HF, Martin R. Multiple sclerosis: a complicated picture of autoimmunity. *NatImmunol*. 2007;8(9):913-9.

McGeachy MJ, Chen Y, Tato CM, Laurence A, Joyce-Shaikh B, Blumenschein WM, et al. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nature Immunology*. 2009 Mar;10(3):314-24.

McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *NatMed*. 2005;11(3):335-9.

McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, et al. Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J ExpMed*. 2001;194(7):873-82.

McRae BL, Vanderlugt CL, Dal Canto MC, Miller SD. Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med*. 1995 Jul 1;182(1):75-85.

Mehling M, Hilbert P, Fritz S, Durovic B, Eichin D, Gasser O, et al. Antigen-specific adaptive immune responses in fingolimod-treated multiple sclerosis patients. *Annals of neurology*. 2011 Feb;69(2):408-13.

Mendel I, Kerlero de Rosbo N, Ben-Nun A. A myelin oligodendrocyte glycoprotein peptide induces typical chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in H-2b mice: fine specificity and T cell receptor V beta expression of encephalitogenic T cells. *Eur J Immunol*. 1995 Jul;25(7):1951-9.

Miller DH, Khan OA, Sheremata WA, Blumhardt LD, Rice GP, Libonati MA, et al. A controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med*. 2003;348(1):15-23.

Miller F, Fenart L, Landry V, Coisne C, Cecchelli R, Dehouck MP, et al. The MAP kinase pathway mediates transcytosis induced by TNF-alpha in an in vitro blood-brain barrier model. *Eur J Neurosci*. 2005 Aug;22(4):835-44.

Miller SD, Vanderlugt CL, Begolka WS, Pao W, Neville KL, Yauch RL, et al. Epitope spreading leads to myelin-specific autoimmune responses in SJL mice chronically infected with Theiler's virus. *J Neurovirol*. 1997 May;3 Suppl 1:S62-5.

Minden SL, Schiffer RB. Affective disorders in multiple sclerosis. Review and recommendations for clinical research. *Arch Neurol*. 1990 Jan;47(1):98-104.

Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol*. 1986 Apr 1;136(7):2348-57.

Mott JD, Werb Z. Regulation of matrix biology by matrix metalloproteinases. *Curr Opin Cell Biol*. 2004 Oct;16(5):558-64.

Muller WA, Weigl SA, Deng X, Phillips DM. PECAM-1 is required for transendothelial migration of leukocytes. *J Exp Med*. 1993;178(2):449-60.

Munger KL, Levin LI, Hollis BW, Howard NS, Ascherio A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA : the journal of the American Medical Association*. 2006 Dec 20;296(23):2832-8.

Muraro PA, Bielekova B. Emerging therapies for multiple sclerosis. *Neurotherapeutics*. 2007 Oct;4(4):676-92.

Muthian G, Raikwar HP, Rajasingh J, Bright JJ. 1,25 Dihydroxyvitamin-D3 modulates JAK-STAT pathway in IL-12/IFN γ axis leading to Th1 response in experimental allergic encephalomyelitis. *J Neurosci Res*. 2006 May 15;83(7):1299-309.

Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, et al. Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *The Journal of clinical investigation*. 2003 Oct;112(7):1037-48.

Nakagawa S, Deli MA, Nakao S, Honda M, Hayashi K, Nakaoke R, et al. Pericytes from brain microvessels strengthen the barrier integrity in primary cultures of rat brain endothelial cells. *Cell Mol Neurobiol*. 2007 Sep;27(6):687-94.

Nakamura K, Kitani A, Strober W. Cell contact-dependent immunosuppression by CD4(+)CD25(+) regulatory T cells is mediated by cell surface-bound transforming growth factor beta. *JExpMed*. 2001;194(5):629-44.

Nath N, Giri S, Prasad R, Singh AK, Singh I. Potential targets of 3-hydroxy-3-methylglutaryl coenzyme A reductase inhibitor for multiple sclerosis therapy. *J Immunol*. 2004;172(2):1273-86.

Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA. New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends Neurosci*. 2003;26(10):523-30.

Neuhaus O, Wiendl H, Kieseier BC, Archelos JJ, Hemmer B, Stuve O, et al. Multiple sclerosis: Mitoxantrone promotes differential effects on immunocompetent cells in vitro. *J Neuroimmunol*. 2005 Nov;168(1-2):128-37.

Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci*. 2002a;25(6):313-9.

- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H. Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* 2002b Jun;25(6):313-9.
- Noble LJ, Donovan F, Igarashi T, Goussev S, Werb Z. Matrix metalloproteinases limit functional recovery after spinal cord injury by modulation of early vascular events. *J Neurosci.* 2002 Sep 1;22(17):7526-35.
- Nourshargh S, Krombach F, Dejana E. The role of JAM-A and PECAM-1 in modulating leukocyte infiltration in inflamed and ischemic tissues. *J LeukocBiol.* 2006;80(4):714-8.
- O'Connor PW, Goodman A, Willmer-Hulme AJ, Libonati MA, Metz L, Murray RS, et al. Randomized multicenter trial of natalizumab in acute MS relapses: clinical and MRI effects. *Neurology.* 2004;62(11):2038-43.
- Obermeier B, Mentele R, Malotka J, Kellermann J, Kumpfel T, Wekerle H, et al. Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *Nat Med.* 2008 Jun;14(6):688-93.
- Oksenberg JR, Hauser SL. Genetics of multiple sclerosis. *NeurolClin.* 2005;23(1):61-75, vi.
- Olitsky PK, Yager RH. Experimental disseminated encephalomyelitis in white mice. *J Exp Med.* 1949 Sep;90(3):213-24.
- Opsahl ML, Kennedy PG. Early and late HHV-6 gene transcripts in multiple sclerosis lesions and normal appearing white matter. *Brain : a journal of neurology.* 2005 Mar;128(Pt 3):516-27.
- Orton SM, Herrera BM, Yee IM, Valdar W, Ramagopalan SV, Sadovnick AD, et al. Sex ratio of multiple sclerosis in Canada: a longitudinal study. *Lancet Neurol.* 2006 Nov;5(11):932-6.
- Osada T, Gu YH, Kanazawa M, Tsubota Y, Hawkins BT, Spatz M, et al. Interendothelial claudin-5 expression depends on cerebral endothelial cell-matrix adhesion by beta(1)-integrins. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2011 Jul 20.

Owens T, Sriram S. The immunology of multiple sclerosis and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis. *NeurolClin*. 1995;13(1):51-73.

Pandiyan P, Zheng L, Ishihara S, Reed J, Lenardo MJ. CD4+CD25+Foxp3+ regulatory T cells induce cytokine deprivation-mediated apoptosis of effector CD4+ T cells. *Nature Immunology*. 2007 Dec;8(12):1353-62.

Pardridge W. *Brain Drug Targeting: The Future of Brain Drug Development* Cambridge University Press; 2001.

Pashenkov M, Huang YM, Kostulas V, Haglund M, Soderstrom M, Link H. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain*. 2001;124(Pt 3):480-92.

Paul F, Waiczies S, Wuerfel J, Bellmann-Strobl J, Dorr J, Waiczies H, et al. Oral high-dose atorvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *PLoS One*. 2008;3(4):e1928.

Perlmutter LS, Chui HC. Microangiopathy, the vascular basement membrane and Alzheimer's disease: a review. *Brain Res Bull*. 1990 May;24(5):677-86.

Persidsky Y, Ramirez SH, Haorah J, Kanmogne GD. Blood-brain barrier: structural components and function under physiologic and pathologic conditions. *J NeuroimmunePharmacol*. 2006;1(3):223-36.

Peters PJ, Borst J, Oorschot V, Fukuda M, Krahenbuhl O, Tschopp J, et al. Cytotoxic T lymphocyte granules are secretory lysosomes, containing both perforin and granzymes. *J Exp Med*. 1991 May 1;173(5):1099-109.

Petty MA, Lo EH. Junctional complexes of the blood-brain barrier: permeability changes in neuroinflammation. *Prog Neurobiol*. 2002 Dec;68(5):311-23.

Phillipson M, Heit B, Colarusso P, Liu L, Ballantyne CM, Kubes P. Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade. *J Exp Med*. 2006 Nov 27;203(12):2569-75.

Picca CC, Larkin J, 3rd, Boesteanu A, Lerman MA, Rankin AL, Caton AJ. Role of TCR specificity in CD4+ CD25+ regulatory T-cell selection. *Immunol Rev.* 2006 Aug;212:74-85.

Pipkin ME, Lieberman J. Delivering the kiss of death: progress on understanding how perforin works. *Curr Opin Immunol.* 2007 Jun;19(3):301-8.

Plumb J, McQuaid S, Mirakhur M, Kirk J. Abnormal endothelial tight junctions in active lesions and normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2002;12(2):154-69.

Pohl D, Krone B, Rostasy K, Kahler E, Brunner E, Lehnert M, et al. High seroprevalence of Epstein-Barr virus in children with multiple sclerosis. *Neurology.* 2006 Dec 12;67(11):2063-5.

Pollinger B, Krishnamoorthy G, Berer K, Lassmann H, Bosl MR, Dunn R, et al. Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J Exp Med.* 2009 Jun 8;206(6):1303-16.

Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, et al. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 2006 Mar 2;354(9):899-910.

Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Dittel BN. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res.* 2005 Aug 1;81(3):374-89.

Prat A, Al-Asmi A, Duquette P, Antel JP. Lymphocyte migration and multiple sclerosis:relation with disease course and therapy. *AnnNeurol.* 1999;46(2):253-6.

Prat A, Antel J. Pathogenesis of multiple sclerosis. *CurrOpinNeurol.* 2005;18(3):225-30.

Prat A, Biernacki K, Lavoie JF, Poirier J, Duquette P, Antel JP. Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *ArchNeurol.* 2002;59(3):391-7.

Prat A, Biernacki K, Pouly S, Nalbantoglu J, Couture R, Antel JP. Kinin B1 receptor expression and function on human brain endothelial cells. *J Neuropathol Exp Neurol*. 2000;59(10):896-906.

Prat A, Biernacki K, Wosik K, Antel JP. Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia*. 2001;36(2):145-55.

Qin H, Wang L, Feng T, Elson CO, Niyongere SA, Lee SJ, et al. TGF-beta promotes Th17 cell development through inhibition of SOCS3. *J Immunol*. 2009 Jul 1;183(1):97-105.

Ramagopalan SV, Knight JC, Ebers GC. Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Curr Opin Neurol*. 2009 Jun;22(3):219-25.

Randolph GJ, Beaulieu S, Lebecque S, Steinman RM, Muller WA. Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science*. 1998;282(5388):480-3.

Randolph GJ, Sanchez-Schmitz G, Liebman RM, Schakel K. The CD16(+) (Fc γ R3(+/+)) subset of human monocytes preferentially becomes migratory dendritic cells in a model tissue setting. *J Exp Med*. 2002;196(4):517-27.

Ransohoff RM. The chemokine system in neuroinflammation: an update. *J Infect Dis*. 2002;186 Suppl 2:S152-S6.

Ransohoff RM, Kivisakk P, Kidd G. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*. 2003;3(7):569-81.

Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, et al. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nature Immunology*. 2009 May;10(5):514-23.

Rifa'i M, Kawamoto Y, Nakashima I, Suzuki H. Essential roles of CD8+CD122+ regulatory T cells in the maintenance of T cell homeostasis. *J Exp Med*. 2004 Nov 1;200(9):1123-34.

Rocha B, Tanchot C. Towards a cellular definition of CD8+ T-cell memory: the role of CD4+ T-cell help in CD8+ T-cell responses. *Curr Opin Immunol*. 2004 Jun;16(3):259-63.

Rodriguez M. Effectors of demyelination and remyelination in the CNS: implications for multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 2007 Apr;17(2):219-29.

Rommer PS, Patejdl R, Winkelmann A, Benecke R, Zettl UK. Rituximab for secondary progressive multiple sclerosis: a case series. *CNS Drugs.* 2011 Jul 1;25(7):607-13.

Rose NR, Bona C. Defining criteria for autoimmune diseases (Witebsky's postulates revisited). *Immunol Today.* 1993 Sep;14(9):426-30.

Rovaris M, Agosta F, Sormani MP, Inglese M, Martinelli V, Comi G, et al. Conventional and magnetization transfer MRI predictors of clinical multiple sclerosis evolution: a medium-term follow-up study. *Brain : a journal of neurology.* 2003 Oct;126(Pt 10):2323-32.

Rubin LL, Barbu K, Bard F, Cannon C, Hall DE, Horner H, et al. Differentiation of brain endothelial cells in cell culture. *AnnNYAcadSci.* 1991a;633:420-5.

Rubin LL, Hall DE, Porter S, Barbu K, Cannon C, Horner HC, et al. A cell culture model of the blood-brain barrier. *The Journal of cell biology.* 1991b Dec;115(6):1725-35.

Ruggeri ZM. Von Willebrand factor, platelets and endothelial cell interactions. *J ThrombHaemost.* 2003;1(7):1335-42.

Ruiz PJ, Garren H, Ruiz IU, Hirschberg DL, Nguyen LV, Karpuj MV, et al. Suppressive immunization with DNA encoding a self-peptide prevents autoimmune disease: modulation of T cell costimulation. *J Immunol.* 1999 Mar 15;162(6):3336-41.

Saikali P, Antel JP, Newcombe J, Chen Z, Freedman M, Blain M, et al. NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *JNeurosci.* 2007a;27(5):1220-8.

Saikali P, Antel JP, Newcombe J, Chen Z, Freedman M, Blain M, et al. NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurosci.* 2007b Jan 31;27(5):1220-8.

Sakaguchi S. Naturally arising CD4⁺ regulatory t cells for immunologic self-tolerance and negative control of immune responses. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:531-62.

Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A. Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol.* 2004;22:745-63.

Sallusto F, Lenig D, Forster R, Lipp M, Lanzavecchia A. Two subsets of memory T lymphocytes with distinct homing potentials and effector functions. *Nature.* 1999;401(6754):708-12.

Samson K. Experimental multiple sclerosis vascular shunting procedure halted at Stanford. *Annals of neurology.* 2010 Jan;67(1):A13-5.

Sanfilippo MP, Benedict RH, Weinstock-Guttman B, Bakshi R. Gray and white matter brain atrophy and neuropsychological impairment in multiple sclerosis. *Neurology.* 2006 Mar 14;66(5):685-92.

Sarra M, Pallone F, Macdonald TT, Monteleone G. IL-23/IL-17 axis in IBD. *Inflamm Bowel Dis.* 2010 Oct;16(10):1808-13.

Savettieri G, Di Liegro I, Catania C, Licata L, Pitarresi GL, D'Agostino S, et al. Neurons and ECM regulate occludin localization in brain endothelial cells. *Neuroreport.* 2000 Apr 7;11(5):1081-4.

Sawcer S, Jones HB, Feakes R, Gray J, Smaldon N, Chataway J, et al. A genome screen in multiple sclerosis reveals susceptibility loci on chromosome 6p21 and 17q22. *NatGenet.* 1996;13(4):464-8.

Saxena A, Bauer J, Scheikl T, Zappulla J, Audebert M, Desbois S, et al. Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *JImmunol.* 2008;181(3):1617-21.

Schenkel AR, Chew TW, Muller WA. Platelet endothelial cell adhesion molecule deficiency or blockade significantly reduces leukocyte emigration in a majority of mouse strains. *J Immunol.* 2004 Nov 15;173(10):6403-8.

Schumacker GA, Beebe G, Kibler RF, Kurland LT, Kurtzke JF, McDowell F, et al. Problems of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis: Report by the Panel on the Evaluation of Experimental Trials of Therapy in Multiple Sclerosis. *Ann N Y Acad Sci.* 1965 Mar 31;122:552-68.

Scott LJ. Fingolimod: a review of its use in the management of relapsing-remitting multiple sclerosis. *CNS Drugs*. 2011 Aug 1;25(8):673-98.

Sedlakova R, Shivers RR, Del Maestro RF. Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1999 Jan;31(1):149-61.

Seguin R, Biernacki K, Rotondo RL, Prat A, Antel JP. Regulation and functional effects of monocyte migration across human brain-derived endothelial cells. *J NeuropatholExpNeurol*. 2003;62(4):412-9.

Serafini B, Columba-Cabezas S, Di Rosa F, Aloisi F. Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *AmJ Pathol*. 2000;157(6):1991-2002.

Serafini B, Rosicarelli B, Magliozzi R, Stigliano E, Capello E, Mancardi GL, et al. Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J NeuropatholExpNeurol*. 2006;65(2):124-41.

Shedlock DJ, Shen H. Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory. *Science*. 2003 Apr 11;300(5617):337-9.

Shedlock DJ, Whitmire JK, Tan J, MacDonald AS, Ahmed R, Shen H. Role of CD4 T cell help and costimulation in CD8 T cell responses during *Listeria monocytogenes* infection. *J Immunol*. 2003 Feb 15;170(4):2053-63.

Shivers RR, Arthur FE, Bowman PD. Induction of gap junctions and brain endothelium-like tight junctions in cultured bovine endothelial cells: local control of cell specialization. *J Submicrosc Cytol Pathol*. 1988 Jan;20(1):1-14.

Sicotte NL, Liva SM, Klutch R, Pfeiffer P, Bouvier S, Odesa S, et al. Treatment of multiple sclerosis with the pregnancy hormone estriol. *Annals of neurology*. 2002 Oct;52(4):421-8.

Siegel RM, Chan FK, Chun HJ, Lenardo MJ. The multifaceted role of Fas signaling in immune cell homeostasis and autoimmunity. *Nature Immunology*. 2000 Dec;1(6):469-74.

Sinha AA, Lopez MT, McDevitt HO. Autoimmune diseases: the failure of self tolerance. *Science*. 1990 Jun 15;248(4961):1380-8.

Sobel ES, Kakkanaiiah VN, Cohen PL, Eisenberg RA. Correction of gld autoimmunity by co-infusion of normal bone marrow suggests that gld is a mutation of the Fas ligand gene. *Int Immunol*. 1993 Oct;5(10):1275-8.

Sobel RA, Hinojoza JR, Maeda A, Chen M. Endothelial cell integrin laminin receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Am J Pathol*. 1998 Aug;153(2):405-15.

Sospedra M, Martin R. Immunology of multiple sclerosis. *AnnuRevImmunol*. 2005;23:683-747.

Spach KM, Nashold FE, Dittel BN, Hayes CE. IL-10 signaling is essential for 1,25-dihydroxyvitamin D₃-mediated inhibition of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2006 Nov 1;177(9):6030-7.

Sprent J, Surh CD. Generation and maintenance of memory T cells. *Curr Opin Immunol*. 2001 Apr;13(2):248-54.

Springer TA. Traffic signals for lymphocyte recirculation and leukocyte emigration: the multistep paradigm. *Cell*. 1994;76(2):301-14.

Stanislaus R, Gilg AG, Singh AK, Singh I. Immunomodulation of experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rats by Lovastatin. *Neurosci Lett*. 2002 Nov 29;333(3):167-70.

Stohlman SA, Bergmann CC, Lin MT, Cua DJ, Hinton DR. CTL effector function within the central nervous system requires CD4⁺ T cells. *J Immunol*. 1998;160(6):2896-904.

Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *NatMed*. 2008;14(3):337-42.

Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*. 2006;1(4):1810-9.

Stuve O. The effects of natalizumab on the innate and adaptive immune system in the central nervous system. *J Neurol Sci*. 2008 Nov 15;274(1-2):39-41.

Stuve O, Marra CM, Jerome KR, Cook L, Cravens PD, Cepok S, et al. Immune surveillance in multiple sclerosis patients treated with natalizumab. *AnnNeurol*. 2006a;59(5):743-7.

Stuve O, Prod'homme T, Youssef S, Dunn S, Neuhaus O, Weber M, et al. Statins as potential therapeutic agents in multiple sclerosis. *CurrNeurolNeurosciRep*. 2004;4(3):237-44.

Stuve O, Youssef S, Weber MS, Nessler S, von Budingen HC, Hemmer B, et al. Immunomodulatory synergy by combination of atorvastatin and glatiramer acetate in treatment of CNS autoimmunity. *The Journal of clinical investigation*. 2006b Apr;116(4):1037-44.

Suda T, Takahashi T, Golstein P, Nagata S. Molecular cloning and expression of the Fas ligand, a novel member of the tumor necrosis factor family. *Cell*. 1993 Dec 17;75(6):1169-78.

Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, et al. Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *JImmunol*. 2001;166(12):7579-87.

Sun JB, Olsson T, Wang WZ, Xiao BG, Kostulas V, Fredrikson S, et al. Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls. *Eur J Immunol*. 1991 Jun;21(6):1461-8.

Sun JC, Bevan MJ. Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help. *Science*. 2003 Apr 11;300(5617):339-42.

Sundstrom P, Wahlin A, Ambarki K, Birgander R, Eklund A, Malm J. Venous and cerebrospinal fluid flow in multiple sclerosis: a case-control study. *Annals of neurology*. 2010 Aug;68(2):255-9.

Svejgaard A. The immunogenetics of multiple sclerosis. *Immunogenetics*. 2008 Jun;60(6):275-86.

Tadokoro CE, Shakhar G, Shen S, Ding Y, Lino AC, Maraver A, et al. Regulatory T cells inhibit stable contacts between CD4+ T cells and dendritic cells in vivo. *J Exp Med*. 2006 Mar 20;203(3):505-11.

Tang Q, Adams JY, Tooley AJ, Bi M, Fife BT, Serra P, et al. Visualizing regulatory T cell control of autoimmune responses in nonobese diabetic mice. *Nat Immunol*. 2006;7(1):83-92.

Teitelbaum D, Meshorer A, Hirshfeld T, Arnon R, Sela M. Suppression of experimental allergic encephalomyelitis by a synthetic polypeptide. *Eur J Immunol*. 1971 Aug;1(4):242-8.

Theien BE, Vanderlugt CL, Eagar TN, Nickerson-Nutter C, Nazareno R, Kuchroo VK, et al. Discordant effects of anti-VLA-4 treatment before and after onset of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest*. 2001;107(8):995-1006.

Thompson AJ, Kermode AG, MacManus DG, Kendall BE, Kingsley DP, Moseley IF, et al. Patterns of disease activity in multiple sclerosis: clinical and magnetic resonance imaging study. *Bmj*. 1990 Mar 10;300(6725):631-4.

Tobert JA. Lovastatin and beyond: the history of the HMG-CoA reductase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*. 2003 Jul;2(7):517-26.

Tran EH, Hardin-Pouzet H, Verge G, Owens T. Astrocytes and microglia express inducible nitric oxide synthase in mice with experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 1997 Apr;74(1-2):121-9.

Tran EH, Hoekstra K, van Rooijen N, Dijkstra CD, Owens T. Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *J Immunol*. 1998;161(7):3767-75.

Traugott U, Reinherz EL, Raine CS. Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. *Science*. 1983;219(4582):308-10.

Trotter JL, Clark HB, Collins KG, Wegeschiede CL, Scarpellini JD. Myelin proteolipid protein induces demyelinating disease in mice. *J Neurol Sci*. 1987 Jun;79(1-2):173-88.

Tubridy N, Behan PO, Capildeo R, Chaudhuri A, Forbes R, Hawkins CP, et al. The effect of anti-alpha4 integrin antibody on brain lesion activity in MS. The UK Antegren Study Group. *Neurology*. 1999;53(3):466-72.

Ueno M. Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features. *CurrMedChem*. 2007;14(11):1199-206.

Van AG, Van RM, Sciort R, Dubois B, Vermeire S, Noman M, et al. Progressive multifocal leukoencephalopathy after natalizumab therapy for Crohn's disease. *NEnglJMed*. 2005;353(4):362-8.

van den Berg WB, Miossec P. IL-17 as a future therapeutic target for rheumatoid arthritis. *Nat Rev Rheumatol*. 2009 Oct;5(10):549-53.

van der Mei IA, Ponsonby AL, Blizzard L, Dwyer T. Regional variation in multiple sclerosis prevalence in Australia and its association with ambient ultraviolet radiation. *Neuroepidemiology*. 2001 Aug;20(3):168-74.

Vanderlugt CL, Neville KL, Nikcevic KM, Eagar TN, Bluestone JA, Miller SD. Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoepitopes in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 2000 Jan 15;164(2):670-8.

Voehringer D, Blaser C, Grawitz AB, Chisari FV, Buerki K, Pircher H. Break of T cell ignorance to a viral antigen in the liver induces hepatitis. *J Immunol*. 2000 Sep 1;165(5):2415-22.

Vollmer T, Key L, Durkalski V, Tyor W, Corboy J, Markovic-Plese S, et al. Oral simvastatin treatment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Lancet*. 2004;363(9421):1607-8.

von Andrian UH, Engelhardt B. Alpha4 integrins as therapeutic targets in autoimmune disease. *NEnglJMed*. 2003;348(1):68-72.

Waehre T, Damas JK, Gullestad L, Holm AM, Pedersen TR, Arnesen KE, et al. Hydroxymethylglutaryl coenzyme a reductase inhibitors down-regulate chemokines and chemokine receptors in patients with coronary artery disease. *J Am Coll Cardiol*. 2003 May 7;41(9):1460-7.

Wandinger K, Jabs W, Siekhaus A, Bubel S, Trillenber P, Wagner H, et al. Association between clinical disease activity and Epstein-Barr virus reactivation in MS. *Neurology*. 2000 Jul 25;55(2):178-84.

Wang FI, Stohlman SA, Fleming JO. Demyelination induced by murine hepatitis virus JHM strain (MHV-4) is immunologically mediated. *J Neuroimmunol.* 1990 Nov;30(1):31-41.

Watanabe-Fukunaga R, Brannan CI, Copeland NG, Jenkins NA, Nagata S. Lymphoproliferation disorder in mice explained by defects in Fas antigen that mediates apoptosis. *Nature.* 1992 Mar 26;356(6367):314-7.

Wattjes MP, van Oosten BW, de Graaf WL, Seewann A, Bot JC, van den Berg R, et al. No association of abnormal cranial venous drainage with multiple sclerosis: a magnetic resonance venography and flow-quantification study. *J Neurol Neurosurg Psychiatry.* 2011 Apr;82(4):429-35.

Waubant E, Goodkin DE, Gee L, Bacchetti P, Sloan R, Stewart T, et al. Serum MMP-9 and TIMP-1 levels are related to MRI activity in relapsing multiple sclerosis. *Neurology.* 1999 Oct 22;53(7):1397-401.

Weitz-Schmidt G, Welzenbach K, Brinkmann V, Kamata T, Kallen J, Bruns C, et al. Statins selectively inhibit leukocyte function antigen-1 by binding to a novel regulatory integrin site. *NatMed.* 2001;7(6):687-92.

Wherry EJ, Ahmed R. Memory CD8 T-cell differentiation during viral infection. *J Virol.* 2004 Jun;78(11):5535-45.

Williams MA, Bevan MJ. Effector and memory CTL differentiation. *Annu Rev Immunol.* 2007;25:171-92.

Wojciak-Stothard B, Ridley AJ. Shear stress-induced endothelial cell polarization is mediated by Rho and Rac but not Cdc42 or PI 3-kinases. *The Journal of cell biology.* 2003 Apr 28;161(2):429-39.

Wojciak-Stothard B, Williams L, Ridley AJ. Monocyte adhesion and spreading on human endothelial cells is dependent on Rho-regulated receptor clustering. *The Journal of cell biology.* 1999 Jun 14;145(6):1293-307.

Wolburg H, Lippoldt A. Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *VasculPharmacol.* 2002;38(6):323-37.

Wolburg H, Wolburg-Buchholz K, Liebner S, Engelhardt B. Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse. *Neurosci Lett*. 2001 Jul 13;307(2):77-80.

Wolburg K, Gerhardt H, Schulz M, Wolburg H, Engelhardt B. Ultrastructural localization of adhesion molecules in the healthy and inflamed choroid plexus of the mouse. *Cell and tissue research*. 1999 May;296(2):259-69.

Wong D, Prameya R, Dorovini-Zis K. In vitro adhesion and migration of T lymphocytes across monolayers of human brain microvessel endothelial cells: regulation by ICAM-1, VCAM-1, E-selectin and PECAM-1. *J NeuropatholExpNeurol*. 1999;58(2):138-52.

Wong GH, Bartlett PF, Clark-Lewis I, Battye F, Schrader JW. Inducible expression of H-2 and Ia antigens on brain cells. *Nature*. 1984 Aug 23-29;310(5979):688-91.

Wosik K, Cayrol R, Dodelet-Devillers A, Berthelet F, Bernard M, Moundjian R, et al. Angiotensin II Controls Occludin Function and Is Required for Blood Brain Barrier Maintenance: Relevance to Multiple Sclerosis. *J Neurosci*. 2007;27(34):9032-42.

Wu GF, Perlman S. Macrophage infiltration, but not apoptosis, is correlated with immune-mediated demyelination following murine infection with a neurotropic coronavirus. *J Virol*. 1999 Oct;73(10):8771-80.

Yagi H, Nomura T, Nakamura K, Yamazaki S, Kitawaki T, Hori S, et al. Crucial role of FOXP3 in the development and function of human CD25+CD4+ regulatory T cells. *Int Immunol*. 2004 Nov;16(11):1643-56.

Yamout B, Herlopian A, Issa Z, Habib RH, Fawaz A, Salame J, et al. Extracranial venous stenosis is an unlikely cause of multiple sclerosis. *Mult Scler*. 2010 Nov;16(11):1341-8.

Yednock TA, Cannon C, Fritz LC, Sanchez-Madrid F, Steinman L, Karin N. Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin. *Nature*. 1992;356(6364):63-6.

Yeo TW, De Jager PL, Gregory SG, Barcellos LF, Walton A, Goris A, et al. A second major histocompatibility complex susceptibility locus for multiple sclerosis. *Annals of neurology*. 2007 Mar;61(3):228-36.

Yong VW. Differential mechanisms of action of interferon-beta and glatiramer acetate in MS. *Neurology*. 2002;59(6):802-8.

Yong VW. Metalloproteinases: mediators of pathology and regeneration in the CNS. *Nat Rev Neurosci*. 2005 Dec;6(12):931-44.

Yong VW, Chabot S, Stuve O, Williams G. Interferon beta in the treatment of multiple sclerosis: mechanisms of action. *Neurology*. 1998;51(3):682-9.

York NR, Mendoza JP, Ortega SB, Benagh A, Tyler AF, Firan M, et al. Immune regulatory CNS-reactive CD8+T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun*. 2010a;35(1):33-44.

York NR, Mendoza JP, Ortega SB, Benagh A, Tyler AF, Firan M, et al. Immune regulatory CNS-reactive CD8+T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Autoimmun*. 2010b Aug;35(1):33-44.

Youssef S, Stuve O, Patarroyo JC, Ruiz PJ, Radosevich JL, Hur EM, et al. The HMG-CoA reductase inhibitor, atorvastatin, promotes a Th2 bias and reverses paralysis in central nervous system autoimmune disease. *Nature*. 2002;420(6911):78-84.

Zamboni P, Galeotti R, Menegatti E, Malagoni AM, Giancesini S, Bartolomei I, et al. A prospective open-label study of endovascular treatment of chronic cerebrospinal venous insufficiency. *J Vasc Surg*. 2009a Dec;50(6):1348-58 e1-3.

Zamboni P, Menegatti E, Galeotti R, Malagoni AM, Tacconi G, Dall'Ara S, et al. The value of cerebral Doppler venous haemodynamics in the assessment of multiple sclerosis. *J Neurol Sci*. 2009b Jul 15;282(1-2):21-7.

Zehntner SP, Brisebois M, Tran E, Owens T, Fournier S. Constitutive expression of a costimulatory ligand on antigen-presenting cells in the nervous system drives demyelinating disease. *FASEB J*. 2003;17(13):1910-2.

Zhang M, Tang H, Guo Z, An H, Zhu X, Song W, et al. Splenic stroma drives mature dendritic cells to differentiate into regulatory dendritic cells. *Nat Immunol*. 2004;5(11):1124-33.

Zhang X, Jin J, Peng X, Ramgolam VS, Markovic-Plese S. Simvastatin inhibits IL-17 secretion by targeting multiple IL-17-regulatory cytokines and by inhibiting the expression of IL-17 transcription factor RORC in CD4⁺ lymphocytes. *J Immunol.* 2008 May 15;180(10):6988-96.

Zlokovic BV, Apuzzo ML. Strategies to circumvent vascular barriers of the central nervous system. *Neurosurgery.* 1998 Oct;43(4):877-8.

