

Université de Montréal

**Ninjurin-1 est une molécule d'adhérence de la barrière hémato-encéphalique
impliquée dans le recrutement de monocytes au sein du système nerveux
central**

par
Simone Terouz

Département de Microbiologie et Immunologie
Faculté de Médecine

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

Décembre, 2010

© Simone Terouz, 2010

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé :

**Ninjurin-1 est une molécule d'adhérence de la barrière hémato-encéphalique
impliquée dans le recrutement de monocytes au sein du système nerveux
central**

présenté par :

Simone Terouz

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes :

Dr. Jacques Thibodeau
Président-rapporteur

Dr. Alexandre Prat
Directeur de recherche

Dre. Nathalie Labrecque
Membre du jury

DÉDICACE

Je dédie ce mémoire à mon oncle, *Khalil T. Houry*.

Je n'oublierais jamais sa foi et sa persévérance, même quand il a souffert de Sclérose en Plaques. Ses conseils et ses leçons de vie resteront toujours avec moi.

REMERCIEMENTS

Je voudrais remercier plusieurs personnes qui ont été à mes côtés durant cette dure et longue épreuve enrichissante, qui est la maîtrise.

Tout d'abord, je remercie ma famille. Ma mère *Jeannette*, mon père *Georges*, ma sœur *Marie*, ma tante *Suzanne* et ma grand-mère *Salma* pour leur amour et leur support inconditionnel!

J'aimerais également remercier mes amis; on a partagé nos joies et nos peines, nos rires et nos larmes!

Je voudrais remercier mon directeur de recherche, le *Dr. Alexandre Prat*, car il m'a donné l'opportunité de réaliser ma maîtrise dans son laboratoire et d'accroître mes connaissances et mes compétences.

De plus, je veux remercier *Monique Bernard*, *Hania Kébir*, *Igal Ifergan*, *Dr. Jorge Ivan Alvarez*, *Lyne Bourbonnière* et *Dr. Steve Gendron* pour leur aide et leur contribution dans ma maîtrise. Merci d'avoir répondu à mes milles et une questions! Merci pour tout.

Aux autres membres du laboratoire, nous ne sommes pas seulement des collègues, mais des amis; *Aurore Dodelet-Devillers*, *Cornelia Pojasdki*, *Lamia Hachehouche*, *Alisha Godshalk*, *Dr. Mike Sabbagh*, *Olivia Saint-Laurent*, *Dre. Émilie Viel*, *Dre. Catherine Larochelle*, *Romain Cayrol*, *Marc-André Lécuyer* et *Dre. Akiko Nakano*.

Un merci aux membres du laboratoire du *Dre. Nathalie Arbour*, nos voisins; *Camille Pittet*, *Dr. Raphael Schneider*, *Lama El-Khoury*, *Téodora Yaneva*, *Diane Beausaigle*, *Fatma Zaguia* et *Alma Nazlie Mohebiany* et ceux du laboratoire du *Dr. Jack Antel* à l'Institut Neurologique de Montréal. Enfin, un dernier merci à *Janet Laganière* pour son aide.

Finalement, je remercie les organismes de financement qui soutiennent la recherche et l'avancement des connaissances.

Merci à tous ceux et celles qui vont lire ce mémoire!

TABLE DES MATIÈRES

LISTE DES SCHÉMAS	4
LISTE DES FIGURES	5
LISTE DES TABLEAUX	7
LISTE DES ABRÉVIATIONS	8
RÉSUMÉ EN FRANÇAIS	11
RÉSUMÉ EN ANGLAIS / ABSTRACT	12
INTRODUCTION	13
1- La sclérose en plaques	14
1.1 Généralités	14
1.2 Les lésions de SEP.....	15
1.3 L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale.....	18
2 - Les lymphocytes T	20
2.1 Généralités	20
2.2 Le rôle des lymphocytes T _H dans la SEP et l'EAE.....	21
3 - La présentation antigénique et les cellules présentatrices d'antigène	24
3.1 Les CPA non-professionnelles et professionnelles.....	25
3.1.1 Les CPA non-professionnelles.....	26
3.1.2 Les CPA professionnelles	26
3.2 Le rôle potentiel de la présentation antigénique dans la SEP et l'EAE.....	27
3.3 Les monocytes.....	28
3.3.1 Généralités.....	28
3.3.2 Les sous-populations et phénotypes des monocytes.....	29
3.3.3 Les monocytes dans la SEP et l'EAE.....	30
3.4 Les macrophages	31
3.4.1 Généralités.....	31
3.4.2 L'activation des macrophages.....	32
3.4.3 Les sous-populations et phénotypes des macrophages	32
3.4.4 Les macrophages dans la SEP et l'EAE	33
3.5 Les cellules dendritiques	34
3.5.1 Généralités.....	34
3.5.2 Le développement et différenciation des DC	34
3.5.3 Les sous-populations et phénotypes des DC.....	36
3.5.4 Les DC dans la SEP et l'EAE.....	37
3.6 Les microglies.....	38

4 - La barrière hémato-encéphalique	39
4.1 La régulation de la perméabilité de la BHE et phénotypes des CE-BHE.....	39
4.1.1 Les jonctions serrées	41
4.1.2 Les jonctions adhérentes	41
4.1.3 La matrice extracellulaire	42
4.1.4 Les astrocytes	43
4.2 Le modèle in vitro de la BHE	43
4.3 La transmigration des leucocytes à travers la BHE	44
4.4 L'intégrité de la BHE dans la SEP et l'EAE.....	46
5 - Ninjurin-1.....	48
5.1 Généralités	48
5.2 L'adhérence homophile médiée par Ninjurin-1	50
5.3 Ninjurin-1 chez différentes espèces.....	51
5.4 Ninjurin-1 et l'inflammation.....	51
5.5 Les maladies impliquant Ninjurin-1	52
HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	53
MATÉRIELS ET MÉTHODES	54
1. Isolation et culture de cellules endothéliales de la BHE humaine.....	55
2. Culture d'astrocytes	56
3. Isolation et culture de leucocytes.....	56
4. Cytométrie de flux	57
5. Immunobuvardage	58
6. Isolation et analyse des radeaux lipidiques	59
7. Immunocytofluorescence	60
8. Colorations histologiques et immunohistofluorescence du tissu du SNC humain et murin.....	61
9. Peptide bloquant Ninjurin-1.....	63
10. Le modèle in vitro de la BHE, transmigration de leucocytes et perméabilité des CE-BHE	63
11. Prolifération des lymphocytes T.....	65
12. Induction de l'EAE, scores cliniques et traitement du tissu.....	65
13. Analyses statistiques	67
RÉSULTATS	68
1. L'expression de Ninjurin-1 augmente dans les cultures primaires de CE-BHE dans un contexte inflammatoire.....	69
2. Ninjurin-1 est préférentiellement exprimée sur les cellules présentatrices d'antigène myéloïdes	75

3. L'expression de Ninjurin-1 augmente dans le SNC des souris atteintes d'EAE	79
4. L'expression de Ninjurin-1 augmente dans les lésions actives au sein du SNC des patients atteints de SEP	82
5. La neutralisation de Ninjurin-1 restreint la migration des monocytes humains CD14 ⁺ à travers les CE-BHE humaines	85
6. La neutralisation de Ninjurin-1 n'a aucun effet sur la perméabilité des CE-BHE.....	91
7. Ninjurin-1 n'affecte ni l'activation et ni la prolifération des lymphocytes T	93
8. La neutralisation in vivo de Ninjurin-1 améliore les scores cliniques des souris atteintes d'EAE et réduit l'infiltration des CPA myéloïdes au sein du SNC.....	96
DISCUSSION ET CONCLUSION.....	103
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	111

LISTE DES SCHÉMAS

Schéma 1 : Lésion active dans le cerveau d'un patient atteint de SEP.....	17
Schéma 2 : La présentation antigénique.....	25
Schéma 3 : La barrière hémato-encéphalique.....	40
Schéma 4 : Le modèle <i>in vitro</i> de la barrière hémato-encéphalique humaine.....	44
Schéma 5 : La transmigration de leucocytes au SNC à travers la BHE.....	46
Schéma 6 : Ninjurin-1.....	49
Schéma 7 : Ninjurin-1 est une molécule d'adhérence de la BHE impliquée dans le recrutement des CPA myéloïdes vers le SNC.....	110

LISTE DES FIGURES

- Figure 1 :** L'expression de Ninjurin-1 est augmentée sur les CE-BHE humaines dans un contexte inflammatoire par cytométrie de flux.....71
- Figure 2 :** L'expression de Ninjurin-1 est augmentée dans les cultures primaires de CE-BHE dans un contexte inflammatoire par immunocytofluorescence.....72
- Figure 3 :** L'expression de Ninjurin-1 est augmentée dans les CE-BHE humaines dans un contexte inflammatoire par immunobuvardage.....73
- Figure 4 :** Ninjurin-1 s'accumule dans les radeaux lipidiques dans les cultures primaires de CE-BHE humaines dans un contexte inflammatoire.....74
- Figure 5 :** Ninjurin-1 est préférentiellement exprimée sur les monocytes humains *ex vivo* par cytométrie de flux.....76
- Figure 6 :** Ninjurin-1 est préférentiellement exprimée par les monocytes par immunobuvardage.....77
- Figure 7 :** Ninjurin-1 est exprimée à de hauts niveaux sur les CPA myéloïdes humaines.....78
- Figure 8 :** L'expression de Ninjurin-1 augmente dans le SNC des souris atteintes d'EAE au pic de la maladie par immunobuvardage.....80
- Figure 9 :** L'expression de Ninjurin-1 augmente dans le SNC des souris atteintes d'EAE au pic de la maladie par immunohistofluorescence.....81
- Figure 10 :** L'expression de Ninjurin-1 augmente dans l'endothélium vasculaire dans des lésions actives au sein du SNC des patients atteints de SEP.....83
- Figure 11 :** L'expression de Ninjurin-1 est élevée dans les CPA myéloïdes au sein des lésions actives cérébrales chez les patients atteints de SEP.....84
- Figure 12 :** La neutralisation *in vitro* de Ninjurin-1, à l'aide d'un peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇, restreint la migration des monocytes CD14⁺ à travers les CE-BHE humaines.....87

- Figure 13 :** La neutralisation *in vitro* de Ninjurin-1 n'a aucun effet sur la transmigration des lymphocytes humains à travers les cultures primaires de CE-BHE humaines.....88
- Figure 14 :** La neutralisation *in vitro* de Ninjurin-1, à l'aide d'un anticorps anti-Ninjurin-1, restreint la migration des monocytes CD14⁺ à travers les CE-BHE humaines.....89
- Figure 15 :** Ninjurin-1 s'accumule autour des monocytes lors de la transmigration à travers les CE-BHE humaines.....90
- Figure 16 :** La neutralisation *in vitro* de Ninjurin-1 n'a pas d'effet sur la perméabilité de la BHE humaine.....92
- Figure 17 :** Ninjurin-1 n'affecte pas la prolifération des lymphocytes T humains...94
- Figure 18 :** Ninjurin-1 n'affecte pas l'activation des lymphocytes T humains.....95
- Figure 19 :** La neutralisation *in vivo* de Ninjurin-1 améliore les scores cliniques des souris atteintes d'EAE.....98
- Figure 20 :** La neutralisation *in vivo* de Ninjurin-1 réduit l'infiltration de cellules immunitaires et la démyélinisation au sein du SNC des souris atteintes d'EAE...100
- Figure 21 :** La neutralisation *in vivo* de Ninjurin-1 réduit l'infiltration des CPA myéloïdes au sein du SNC des souris atteintes d'EAE.....101
- Figure 22 :** La neutralisation *in vivo* de Ninjurin-1 réduit significativement l'infiltration des CPA myéloïdes au sein du SNC des souris atteintes d'EAE.....102

LISTE DES TABLEAUX

Tableau I: Diminution de la sévérité de la maladie chez les souris atteintes d'EAE traitées avec le peptide bloquant Ninj ₂₆₋₃₇	99
---	----

LISTE DES ABRÉVIATIONS

-/-:	déficiencia d'un gène
aa:	acides aminés
ALCAM:	<i>activated leukocyte cell adhesion molecule</i>
APC:	allophycocyanine
BCA:	<i>bicinchoninic acid</i>
BDNF:	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BHE:	barrière hémato-encéphalique
BSA:	<i>bovine albumin serum</i>
CAM :	<i>cellular adhesion molecule</i>
CCL:	ligand des chimiokines C-C
CCR:	récepteur de chimiokines C-C
CD:	<i>cluster of differentiation</i>
CD40L:	CD40 Ligand
CE:	cellules endothéliales
CE-BHE:	cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique
CFA:	<i>Complete Freund's adjuvant</i>
CFSE:	<i>carboxyfluorescein succinimidyl ester</i>
CMH:	complexe majeur d'histocompatibilité
CPA:	cellules présentatrices d'antigène
C-terminale:	<i>carboxyl-terminal</i>
CTLA-4:	<i>cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
CXCL:	ligand des chimiokines C-X-C
DC:	<i>dendritic cells</i>
DMEM:	<i>Dulbecco's modified eagle's medium</i>
DRM:	<i>detergent resistant membrane</i>
EAE:	encéphalite autoimmune (allergique) expérimentale
EBV:	Epstein-Barr virus
ECGS:	<i>endothelial cell growth supplement</i>
FITC:	<i>fluorescein isothiocyanate</i>
GDNF:	<i>glial cell line-derived neurotrophic factor</i>
GFAP:	<i>glial fibrillary acidic protein</i>
GLUT-1:	<i>glucose transporter-1</i>
GM-CSF:	<i>granulocyte macrophage colony-stimulating factor</i>
HLA:	<i>human leukocyte antigen</i>
ICAM-1:	<i>intercellular adhesion molecule-1</i>
IFN-β:	interféron-béta
IFN-γ:	interféron-gamma
IFN-γR:	récepteur de l'interféron-gamma

IgG:	immunoglobuline G
IL:	interleukine
IP-10:	<i>inducible protein-10</i>
JA:	jonctions adhérentes
JAM:	<i>junctional adhesion molecule</i>
JS:	jonctions serrées
kDa:	<i>kiloDalton</i>
LAT-1:	<i>large neutral amino acid transporter</i>
LCR:	liquide céphalorachidien
LFA-1:	<i>lymphocyte function-associated antigen-1</i>
LMP:	leukoencéphalopathie multifocale progressive
LPS:	lipopolysaccharide
MAC-1:	<i>macrophage-1 antigen</i>
MAdCAM:	<i>mucosal addressin cell adhesion molecule</i>
MBP:	<i>myelin basic protein</i>
MCA:	milieu conditionné par les astrocytes
MCAM:	<i>melanoma cell adhesion molecule</i>
MCP-1:	<i>monocyte chemoattractant protein-1</i>
M-CSF:	<i>macrophage colony-stimulating factor</i>
MEC:	matrice extracellulaire
MFI:	<i>mean fluorescence intensity</i>
MIP-1 α :	<i>macrophage inflammatory protein-1alpha</i>
mM:	millimolaire
MMP:	<i>matrix metalloproteinases</i>
MOG :	<i>myelin oligodendrocyte glycoprotein</i>
NAWM:	<i>normal appearing white matter</i>
NijA:	<i>Nerve injury-induced Protein (Ninjurin)-A</i>
Ninjurin-1:	<i>Nerve injury-induced Protein-1</i>
NK:	<i>natural Killer cells</i>
N-terminale:	<i>amino-terminal</i>
O.C.T. TM :	<i>optimal cutting temperature</i>
PAGE:	<i>polyacrylamide gel electrophoresis</i>
PBMC:	<i>peripheral blood mononuclear cells</i>
PBS:	<i>phosphate buffered saline</i>
PECAM-1:	<i>platelet endothelial cell adhesion molecule-1</i>
PLP:	<i>proteolipid protein</i>
PVDF:	<i>polyvinylidene fluoride</i>
RCT:	récepteur des cellules T
RL:	radeaux lipidiques
Rpm:	rotations par minute
RRX:	<i>rhodamine Red X</i>
SA:	sérum d'âne

SBF:	sérum de bovin foetal
SC:	sérum de chèvre
SDF-1:	<i>stromal cell-derived factor-1</i>
SDS:	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SEM:	<i>standard error of mean</i>
SEP:	sclérose en plaques
SH:	sérum humain
SNC:	système nerveux central
SNP:	système nerveux périphérique
TA:	température ambiante
TBS:	<i>tris-buffered saline</i>
T _c :	cellules T cytotoxiques (CD8 ⁺)
TGF-β:	<i>transforming growth factor-beta</i>
T _H :	<i>T helper lymphocyte</i> (lymphocytes T auxiliaires: CD4 ⁺)
TNF-α:	<i>tumor necrosis factor-alpha</i>
T _{reg} :	lymphocyte T régulateur
UEA-I:	<i>Ulex europaeus agglutinin-I</i>
VCAM-1:	<i>vascular cell adhesion molecule-1</i>
VE-cadherin:	<i>vascular endothelial-cadherin</i>
VEGF:	<i>vascular endothelial growth factor</i>
VLA-4:	<i>very late antigen-4</i>
vWF:	<i>von Willebrand factor</i>
ZO:	<i>zona occludens</i>

RÉSUMÉ EN FRANÇAIS

La sclérose en plaques (SEP) est caractérisée par des infiltrations périvasculaires de cellules immunitaires et par de la démyélinisation au sein du système nerveux central (SNC). Ces deux paramètres de la maladie sont associés à la fragilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE). En ce sens, le recrutement des cellules présentatrices d'antigène (CPA) myéloïdes, telles que les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques, dans le SNC à travers la BHE, est une étape cruciale dans l'initiation et la persistance de l'inflammation cérébrale. *Nerve injury-induced protein* (Ninjurin)-1 est une nouvelle molécule d'adhérence qui médie une interaction de type homophilique et dont l'expression sur l'endothélium vasculaire de la BHE humaine fut identifiée grâce à une analyse protéomique des protéines associées à la BHE. Les résultats présentés dans ce mémoire montrent que l'expression de Ninjurin-1 augmente dans un contexte inflammatoire dans les cultures primaires de cellules endothéliales de la BHE (CE-BHE) et sur les CPA myéloïdes humaines *ex vivo* et générées *in vitro*. De plus, les CPA infiltrantes retrouvées dans les lésions cérébrales de patients atteints de SEP et dans le SNC des souris atteintes d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), le modèle murin de la SEP, expriment de hauts niveaux de Ninjurin-1. À l'aide du modèle *in vitro* de la BHE, la neutralisation de Ninjurin-1 restreint spécifiquement la migration des monocytes à travers les CE-BHE sans affecter le recrutement des lymphocytes, ni la perméabilité des CE-BHE. Enfin, les souris atteintes d'EAE et traitées avec un peptide bloquant dirigé contre Ninjurin-1 présentent une maladie moins sévère ainsi qu'une diminution des CPA infiltrant le SNC et ce comparé au groupe contrôle. Ces résultats suggèrent que Ninjurin-1 est une molécule d'adhérence de la BHE impliquée dans le recrutement de CPA myéloïdes au sein du SNC et qu'elle peut être considérée comme une cible thérapeutique potentielle en SEP.

Mots Clés : sclérose en plaques, système nerveux central, encéphalomyélite autoimmune expérimentale, barrière hémato-encéphalique, transmigration, cellules présentatrices d'antigène, monocytes, cellules dendritiques, molécule d'adhérence, *Nerve injury-induced protein* (Ninjurin)-1.

RÉSUMÉ EN ANGLAIS / ABSTRACT

Multiple Sclerosis (MS) is characterized by perivascular infiltrations of immune cells and by demyelination in the central nervous system (CNS). These two hallmarks of the disease are associated with the disruption of the blood-brain barrier (BBB). The recruitment of monocytes, macrophages and dendritic cells, the so-called myeloid antigen-presenting cells (APCs), in the CNS through the BBB is thought to play a crucial role in the initiation and the persistence of the disease. Therefore the identification of the molecular mechanisms involved in the migration of myeloid APCs into the CNS is considered a valid therapeutic option in MS. Nerve injury-induced protein (Ninjurin)-1, a novel adhesion molecule that mediates homophilic binding, was found to be expressed in the vascular endothelium of the BBB following a proteomic screen of human BBB-associated proteins. Ninjurin-1's expression increases during an inflammatory context in primary cultures of endothelial cells of the BBB (BBB-ECs) and on *ex vivo* and *in vitro* generated myeloid APCs. In addition, infiltrating APCs in human MS lesions and in the CNS of the murine model of MS, the mice affected with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), express high levels of Ninjurin-1. Using an experimental model of the BBB, the neutralization of Ninjurin-1 specifically restricts the migration of monocytes across the BBB-ECs without affecting the recruitment of lymphocytes or the permeability of the BBB-ECs. Finally, EAE mice treated with a Ninjurin-1 blocking peptide have reduced disease severity and a reduced infiltration of myeloid APCs in the CNS, as compared to the control group. Our results show that Ninjurin-1 is an adhesion molecule of the BBB involved in the recruitment of myeloid APCs to the CNS and is also a potential therapeutic target to dampen CNS inflammatory processes, as occurs in MS.

Key words: multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, central nervous system, blood-brain barrier, transmigration, antigen-presenting cells, monocytes, dendritic cells, adhesion molecule, Nerve injury-induced protein (Ninjurin)-1.

INTRODUCTION

La migration de leucocytes au sein du système nerveux central (SNC) est un événement important dans le développement de plusieurs maladies neuroinflammatoires, dont la sclérose en plaques (SEP). Plusieurs cellules immunitaires se trouvent dans les lésions de SEP, mais leurs mécanismes de transmigration n'ont pas encore été complètement élucidés. Plusieurs facteurs contribuent à la transmigration des leucocytes et les molécules d'adhérence y jouent un grand rôle. Ainsi, l'étude de leur expression, de leur régulation et de leur fonction permettra d'approfondir nos connaissances sur le mode d'entrée des leucocytes dans le SNC. Dans ce contexte, je me suis intéressée à l'étude d'une nouvelle molécule d'adhérence, soit *Nerve injury-induced protein* (Ninjurin)-1, dans le contexte de la SEP.

1- La sclérose en plaques

1.1 Généralités

La SEP est une maladie chronique de nature auto-immune caractérisée par des lésions inflammatoires démyélinisantes au sein du SNC, qui sont associés à la fragilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE). La SEP se manifeste sous 4 formes : la forme cyclique (80%), la forme progressive primaire (10%), la forme progressive secondaire (50% de la forme cyclique) et la forme progressive récurrente (5%) (Société Canadienne de la Sclérose en Plaques - SCSP). En général, la SEP est une maladie hétérogène et les symptômes varient selon la région où les dommages axonaux ont lieu. Les personnes atteintes de SEP peuvent avoir des dysfonctionnements neurologiques, incluant des troubles de la vision, de la sensibilité et de la locomotion. Deux à 2,5 millions de personnes sont atteintes de SEP à travers le monde (Milo and Kahana, 2010). Cette maladie atteint majoritairement les personnes âgées de 15 à 40 ans, mais peut également se développer durant l'enfance (Yeh et al., 2009). D'ailleurs, la SEP atteint plus de

femmes que d'hommes et selon la Société Canadienne de la SEP, le risque de développer la SEP est trois fois plus élevé chez les femmes que chez les hommes (Société Canadienne de la Sclérose en Plaques - SCSP).

Même si la SEP est connue depuis 1868, la cause de cette maladie n'est toujours pas identifiée et il n'y a aucune façon de prédire l'apparition de la maladie ou de ses symptômes. Des études indiquent qu'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux jouerait des rôles dans l'étiologie de la maladie. Depuis 1973, il est reconnu que la présence de l'allèle *human leukocyte antigen* (HLA)-DR2 sur le chromosome 6 augmente les risques de développer la SEP (Noseworthy et al., 2000; Jersild et al., 1973). De plus, l'emplacement géographique, soit la distance de l'équateur et l'ensoleillement (la carence en vitamine D), affecterait l'incidence et la prévalence de la SEP (Milo and Kahana, 2010). Le Canada s'avère donc être un pays où le risque de développer la SEP est très élevé, comme les autres pays situés loin de l'équateur. Enfin, des infections virales, dont l'infection par le virus Epstein-Barr (EBV), ont aussi été associées à la SEP (Pohl, 2009).

1.2 Les lésions de SEP

Les lésions retrouvées au sein du SNC chez les patients atteints de SEP sont des foyers inflammatoires qui sont associés à des zones de destruction de la gaine de myéline. La gaine de myéline, produite par les oligodendrocytes, enveloppe et protège les axones afin d'isoler les fibres nerveuses du SNC. Malgré le fait que l'étiologie de la SEP ne soit pas connue, la présence de différentes populations de leucocytes dans les lésions de SEP au sein du SNC indique que le système immunitaire est largement impliqué dans la pathogenèse de cette maladie (Becher et al., 2006). La classification des lésions de SEP dépend de la présence ou de l'absence de cellules immunitaires infiltrantes et de la démyélinisation. On retrouve dans la littérature plusieurs classifications pathologiques des lésions en SEP (Lassmann et al., 2001; Bruck et al., 1995; Bo et al., 1994; Trapp et al., 1998).

De ces différents modes de classification nous retenons celui décrit par Bö et Trapp (Bo et al., 1994; Trapp et al., 1998) qui demeure le plus utilisé et le plus simple. D'après cette classification, le matériel cérébral est classé en quatre catégories : 1- la matière blanche d'apparence normale (NAWM - *normal appearing white matter*), 2- les lésions dites actives, 3- les lésions chroniques actives et 4- les lésions chroniques inactives (van, V and De Groot, 2000). La matière blanche d'apparence normale est caractérisée par une absence de démyélinisation (gaine de myéline intacte) et une absence d'infiltration leucocytaire. Les lésions actives sont caractérisées par une démyélinisation active et par la présence d'infiltrats périvasculaires de lymphocytes T et B, ainsi que de macrophages ayant phagocyté de la myéline. Par ailleurs, les lésions chroniques actives sont caractérisées par la démyélinisation et par la présence de leucocytes au pourtour circonférentiel (extrémités) de la lésion. Finalement, les lésions chroniques inactives sont caractérisées par une absence de démyélinisation ou un début de remyélinisation et une absence de cellules infiltrantes.

Normalement, le SNC est défini comme un site dit « immunologiquement privilégié ». Cet aspect de la biologie du SNC est en partie assuré par la BHE. Dans le SNC des patients atteints de SEP, une augmentation de la perméabilité de l'endothélium vasculaire est un des facteurs qui contribue au recrutement de cellules immunitaires dans le SNC. Au sein des lésions actives des patients atteints de SEP (**Schéma 1**) on retrouve différentes populations de cellules immunitaires, telles que des lymphocytes T mémoires ($CD4^+$ et $CD8^+$), des cellules présentatrices d'antigène (CPA) myéloïde (macrophages, cellules dendritiques (DC - *dendritic cells*) et microglies) et des lymphocytes B. Sauf pour les microglies, ces cellules proviennent de la périphérie et transmigrent à travers l'endothélium vasculaire de la BHE. De nombreux facteurs pro-inflammatoires, tels que des cytokines, des chimiokines, des protéases, des dérivés réactifs de l'oxygène et des dépôts de compléments contribuent à la destruction de la gaine de myéline des axones du SNC et à la déstabilisation de la BHE (Korn, 2008; Issazadeh et al., 1995; Van Der Voorn et al., 1999; Kennedy et al., 1998; Berman et al., 1996; Fuentes et al., 1995; Hendriks et al., 2005; Vos et al., 2003; Karpus and Kennedy, 1997; Man et al., 2007; Lacraz et al., 1994; Stamatovic et al., 2008; Abbott et al.,

2006; Argaw et al., 2006). Ces médiateurs pro-inflammatoires proviennent des cellules immunitaires infiltrantes, des cellules résidentes du SNC et de l'endothélium vasculaire de la BHE. Cette perturbation s'observe également au niveau du liquide céphalorachidien (LCR) qui se trouve dans le système ventriculaire et méningé du SNC. Le LCR d'une personne saine contient entre 150,000 et 500,000 cellules immunitaires, tandis que chez les patients atteints de SEP ces chiffres augmentent sensiblement et les comptes cellulaires peuvent être jusqu'à 10 fois plus élevés (Schulz and Engelhardt, 2005). Ainsi, plusieurs facteurs contribuent à la formation des lésions dans la SEP, dont la présence de leucocytes au sein du SNC ainsi que de nombreux facteurs solubles possiblement immunologiques.

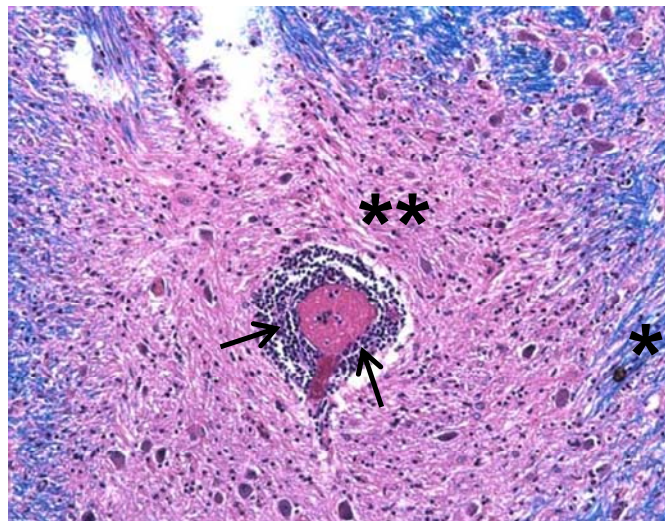


Schéma 1 : Lésion active dans le cerveau d'un patient atteint de SEP.

Coloration au *Luxol Fast Blue* et à l'Hématoxyline & l'Éosine du matériel *post-mortem* du SNC d'un patient atteint de SEP. La coloration au *Luxol Fast Blue*, qui colore la myéline en bleu (*), nous permet de distinguer les régions dans la matière blanche qui sont démyélinisées (**). La gaine de myéline, qui est produite par les oligodendrocytes, enveloppe les axones afin d'isoler les fibres nerveuses du SNC. Les lésions actives de SEP sont caractérisées par une infiltration périvasculaire de cellules immunitaires (flèches) et d'une région démyélinisée qui a perdu la coloration bleutée de la myéline (**).

1.3 L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale

Le modèle animal de la SEP, l'encéphalomyélite autoimmune (allergique) expérimentale (EAE), constitue l'outil le plus répandu pour l'étude de la SEP *in vivo*. Ce modèle, qui est le plus fréquemment induit chez la souris, est grandement utilisé pour récapituler les éléments histopathologiques de la maladie et pour simuler l'inflammation autoimmune et la démyélinisation au sein du SNC (Korn, 2008; Gold et al., 2006). Même si l'EAE est un modèle imparfait, de nombreux aspects de l'EAE semblent récapituler les événements cellulaires et moléculaires observés en SEP. En effet, le SNC des souris atteintes d'EAE contient des lésions démyélinisantes et des infiltrations de lymphocytes T spécifiques à la myéline, de macrophages et de DC (McCandless and Klein, 2007). Ainsi, l'EAE fournit l'information sur le contenu cellulaire des lésions, sur le recrutement des leucocytes et sur l'intégrité de la BHE (Bennett and Stuve, 2009). Chez la souris atteinte d'EAE, la majorité de l'infiltration et de la démyélinisation prend place dans la moelle épinière des animaux. On retrouve aussi des infiltrations de cellules immunitaires dans le cerveau souvent en l'absence de démyélinisation (Kroenke et al., 2010). Ceci contraste avec la maladie humaine où l'infiltration de cellules immunitaires et la démyélinisation prend place principalement dans le cerveau, même si certaines des lésions sont aussi présentes dans la moelle épinière.

Contrairement à la SEP, l'EAE n'est pas une maladie spontanée et son induction est nécessaire pour le développement des lésions. L'EAE peut être induite de façon passive à l'aide d'un transfert adoptif de lymphocytes T auto-réactifs et encéphalitogéniques, c'est-à-dire, dont les récepteurs des cellules T (RCT) sont dirigés et reconnaissent des peptides de la myéline. L'EAE peut être également induite par immunisation active en injectant différents peptides de la myéline avec un adjuvant. Dépendamment de la souche murine et du peptide de la myéline utilisés, les souris peuvent développer plusieurs formes de la maladie. Une maladie monophasique chronique survient suite à une immunisation active des souris de la souche C57BL/6 avec le peptide *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG)₃₅₋₅₅. Les souris de la souche SJL développent une maladie

cyclique lorsqu'elles sont immunisées activement avec le peptide *proteolipid protein* (PLP)₁₃₉₋₁₅₁ et elles développent une maladie cyclique et chronique en présence du peptide *myelin basic protein* (MBP)₈₇₋₉₉ (Baxter, 2007; Emerson et al., 2009). L'immunisation se fait en présence d'un adjuvant, soit l'adjuvant complet de Freund (CFA – *Complete Freund's Adjuvant*), qui augmente l'immunogénicité des peptides de la myéline et qui favorise la fonction des CPA. De plus, l'immunisation est accompagnée d'injections de la toxine pertussique qui permet d'amorcer une réaction immunitaire. La maladie et la manifestation clinique des symptômes est ascendante chez les rongeurs atteints d'EAE et l'attribution d'une classification clinique (scores cliniques) permet de suivre cette ascension et la progression clinique de la maladie. Le système de classification le plus utilisé est décrit comme suit : 1- queue flaccide, 2- ataxie, 2,5- faiblesse des membres inférieurs, 3- paralysie d'un membre inférieur, 4- paralysie des deux membres inférieurs 4,5- faiblesse des membres supérieurs et 5- état moribond. L'EAE induite chez les souris C57BL/6 avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ est un des modèles les plus répandus, car l'étude est de courte durée, soit de 20 à 30 jours, le pic de la maladie a lieu aux alentours du 14^e jour suivant l'immunisation et la souche C57BL/6 est susceptible aux mutations transgéniques. En effet, la souche murine C57BL/6 est la souche murine la plus utilisée, son élevage est simple et la séquence complète de son génome est disponible. Ce modèle permet d'étudier plusieurs aspects de la maladie, tels que l'initiation de la réponse immunitaire, le développement de la maladie, la migration de leucocytes et la neurodégénération.

Chez les animaux atteints d'EAE, la tolérance immunitaire contre le soi est brisée et il y a une expansion de lymphocytes T auto-réactifs dirigés contre la myéline qui migrent jusqu'au SNC pour initier une cascade inflammatoire menant à la démyélinisation et à la dégénération axonale (Becher et al., 2006). D'ailleurs, l'immunisation des souris a lieu dans la périphérie, à l'extérieur du SNC, et la réponse immunitaire initiale, dont l'activation des lymphocytes T naïfs par les CPA, a lieu dans les organes lymphoïdes secondaires (Becher et al., 2006).

2 - Les lymphocytes T

2.1 Généralités

Les lymphocytes T sont des leucocytes qui jouent des rôles spécifiques dans l'immunité acquise. Les lymphocytes T expriment le RCT, soit un complexe de polypeptides qui inclue le *cluster of differentiation* (CD) CD3⁺. Ce complexe RCT-CD3 est en fait le récepteur antigénique qui reconnaît le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) des CPA. La présentation antigénique et la costimulation nécessaires à l'activation des lymphocytes T seront décrits dans la **section 3**. Une fois activés par les CPA, les lymphocytes T se différencient d'abord en lymphocytes effecteurs qui sécrètent différentes cytokines. Ensuite, les lymphocytes T effecteurs deviennent des lymphocytes mémoires, capables de répondre plus rapidement et plus efficacement suite à la rencontre antigénique. Les lymphocytes T activés, effecteurs et mémoires, expriment différents marqueurs d'activation, tels que CD25, CD45RO et CD69 chez l'humain et CD44 et CD69 chez la souris (Kaufmann, 2007). En effet, le marqueur CD25 correspond à la chaîne alpha du récepteur de l'interleukine (IL)-2, un facteur de croissance pour les lymphocytes T qui est sécrété par ces derniers suivant leur interaction avec l'antigène. La prolifération et la polarisation des lymphocytes T a lieu par la suite en fonction des facteurs présents dans leur microenvironnement respectif. Suite à la présentation antigénique, les lymphocytes T naïfs sont activés et se différencient en plusieurs sous-populations de lymphocytes T, dont les lymphocytes T auxiliaires (T_H - *T helper*) et les lymphocytes T cytotoxiques (T_C) qui sont respectivement reconnus par l'expression des molécules membranaires CD4 et CD8. Enfin, il y a les lymphocytes T régulateurs (T_{reg}) qui sont responsables de la tolérance immunologique. Les lymphocytes T_H sont d'intérêt, car ces cellules jouent des rôles importants dans la pathogénèse de la SEP et de l'EAE.

2.2 Le rôle des lymphocytes T_H dans la SEP et l'EAE

Au sein des lésions dans le SNC des patients atteints de SEP et des animaux atteints d'EAE on retrouve plusieurs leucocytes dont des lymphocytes T mémoires. Il est reconnu que la SEP a des caractéristiques d'une maladie auto-immune, puisque les lymphocytes T présents dans le SNC sont auto-réactifs et encéphalitogéniques, car ils reconnaissent des antigènes du soi provenant de la myéline et des oligodendrocytes (Becher et al., 2006). La présence de l'IL-12 permet aux lymphocytes T de se différencier en lymphocytes T_H1 , qui jouent un rôle dans la défense de l'hôte contre les pathogènes intracellulaires et dans l'auto-immunité. L'IL-12 est produite par les macrophages, les DC, les lymphocytes B et les cellules *natural killer* (NK) (D'Andrea et al., 1992; Chan et al., 1991). Les lymphocytes T_H1 sont les principales cellules productrices d'interféron-gamma (IFN- γ), mais elles sécrètent aussi l'IL-2, le *Tumor necrosis factor* (TNF) et le *granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF) (Kaufmann, 2007). La cytokine pro-inflammatoire IFN- γ est retrouvée dans les lésions actives de SEP et chez les rongeurs atteints d'EAE au pic de la maladie (Korn, 2008; Issazadeh et al., 1995). L'EAE peut être transférée grâce à un transfert adoptif avec les lymphocytes T_H1 encéphalitogéniques, mais non avec les lymphocytes T_H2 . Par contre, des souris immunisées avec des peptides de la myéline et déficientes en IFN- γ (IFN- $\gamma^{-/-}$) (Ferber et al., 1996; Chu et al., 2000) ou déficientes du récepteur de l'IFN- γ (IFN- $\gamma R^{-/-}$) (Willenborg et al., 1999) développent l'EAE. Chez ces animaux la maladie est aussi plus sévère (Billiau et al., 1988). D'ailleurs, les souris déficientes en IL-12 (IL-12 $^{-/-}$), qui est nécessaire pour la différenciation des lymphocytes T_H1 , ont une hypersusceptibilité à l'EAE (Becher et al., 2002; Gran et al., 2002; Cua et al., 2003). Pendant des décennies, le paradigme T_H1/T_H2 a été utilisé, mais selon ces dernières observations, il y aurait d'autres facteurs qui joueraient des rôles importants dans la pathogenèse de l'EAE et de la SEP. Il y a quelques années, une nouvelle sous-population de lymphocytes T_H a été identifiée, soit les lymphocytes T_H17 , qui sont importants pour la défense de l'hôte contre les pathogènes extracellulaires et qui jouent des rôles dans l'inflammation et l'auto-immunité (Korn, 2008; Cua et al., 2003). En présence de *transforming growth*

factor-beta (TGF- β), d'IL-6, d'IL-21 et d'IL-23, les lymphocytes T naïfs se différencient et prolifèrent en tant que lymphocytes T_H17 qui sécrètent l'IL-17, l'IL-21, l'IL-22 et l'IL-23 (Jager et al., 2009; Korn, 2008; Bettelli et al., 2006; Manel et al., 2008; Yang et al., 2008; Veldhoen and Stockinger, 2006). L'IL-6 est sécrétée par plusieurs cellules, dont les monocytes, les macrophages, les DC, les lymphocytes T et les cellules endothéliales (CE) vasculaires (Ifergan et al., 2008; Bailey et al., 2007; McMahon et al., 2005; Ifergan et al., 2008; Ifergan et al., 2008); et l'IL-23, qui est produite par les macrophages et les DC (McKenzie et al., 2006; Bailey et al., 2007). L'IL-23 est importante pour l'expansion et la stabilisation des populations de lymphocytes T_H17 encéphalitogéniques qui sont aussi capables de transférer l'EAE. Les souris déficientes en IL-23 (IL-23^{-/-}) ou du récepteur de l'IL-23 (IL-23R^{-/-}) ne développent pas d'EAE (Cua et al., 2003). Kébir *et al.* ont démontré que les lymphocytes T_H17 sont capables de traverser la BHE, d'infiltrer le SNC et d'induire l'inflammation cérébrale (Kebir et al., 2007). Ces cytokines produites par les lymphocytes pro-inflammatoires T_H1 et T_H17 contribuent au recrutement d'autres cellules au SNC en augmentant l'expression de différentes molécules d'adhérence et à l'augmentation de la perméabilité de la BHE en diminuant l'expression de protéines jonctionnelles qui seront décrites dans la **section 4**.

De nombreuses études ont démontré que l'EAE est une maladie médiée par les lymphocytes T auto-réactifs dirigés contre la myéline. Ces observations sont confirmées par le fait qu'un transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ encéphalitogéniques dans des animaux sains peut induire l'EAE (Becher et al., 2006; Engelhardt, 2006). Mais, seuls les lymphocytes T activés sont capables de traverser la BHE et d'induire l'EAE, comparativement aux lymphocytes T naïfs (Korn, 2008; Flugel et al., 2001; Wekerle et al., 1987; Hickey et al., 1991; Engelhardt, 2006). Dans le cerveau humain, les lésions actives de SEP contiennent des lymphocytes T auto-réactifs provenant du système immunitaire périphérique (Prat et al., 2002) et chez la souris atteinte d'EAE, il est accepté que l'activation et l'expansion des lymphocytes T encéphalitogéniques a lieu à la fois dans la périphérie et dans le SNC (Becher et al., 2006). L'activation, la polarisation et la réactivation des lymphocytes T_H1 et T_H17 mémoires auto-réactifs, qui sont des effecteurs cruciaux dans la SEP et l'EAE, dépendent en grande partie de leurs

interactions avec les CPA myéloïdes, soit les monocytes, les macrophages et les DC et des cytokines sécrétées par ces derniers. De plus, c'est grâce aux CPAs que les lymphocytes T passent de leur état naïf à leur état mémoire, sont activées, prolifèrent, traversent la BHE et sécrètent différentes cytokines et chimiokines contribuant aux dommages tissulaires au sein du SNC.

3 - La présentation antigénique et les cellules présentatrices d'antigène

La présence de CPA est primordiale pour qu'un lymphocyte T naïf soit activé. Suite à des signaux associés aux cytokines pro-inflammatoires ou aux pathogènes, les CPA apprêtent les antigènes, deviennent matures et migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter ces antigènes aux lymphocytes T. En effet, les CPA présentent les antigènes par l'intermédiaire des molécules du CMH au complexe RCT-CD3. Cette interaction est suivie de signaux de costimulation qui permettent l'activation et la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion de cytokines et l'augmentation de l'expression de récepteurs de surface, tels que CD25, le récepteur du facteur de croissance IL-2 (Hathcock et al., 1994).

Les CPA et la présentation antigénique sont importantes pour initier et maintenir la réponse immunitaire. Les cellules qui présentent l'antigène aux cellules T CD4⁺ par l'intermédiaire des glycoprotéines membranaires du CMH de classe II sont appelées les CPA. L'activation complète des lymphocytes CD4 T_H nécessite deux signaux importants (**Schéma 2**). D'une part, les CPA apprêtent l'antigène et le présentent par l'intermédiaire des molécules du CMH de classe II. En effet, suite à l'apprêtement des antigènes, les molécules du CMH de classe II sont transportées à la surface membranaire des CPA et ces dernières présentent ainsi l'antigène au complexe RCT-CD3. Cette interaction est suivie du deuxième signal, soit les signaux de costimulation, qui renforce le premier signal pour permettre l'activation, la prolifération et la différenciation des lymphocytes T. Les principales molécules de costimulation font partie de la famille B7, B7-1/CD80 et B7-2/CD86, qui sont exprimées par les CPA et qui se lient à leurs récepteurs sur les lymphocytes T, soit CD28 ou CD152/*cytotoxic T-lymphocyte antigen* (CTLA)-4 (Arjmandi et al., 2009). Dans le contexte du CMH de classe II, l'interaction des molécules de costimulation B7 avec CD28 active les gènes qui permettent la prolifération des lymphocytes T, la sécrétion de cytokines, dont l'IL-2, et l'augmentation de l'expression de son récepteur, l'IL-2R (Hathcock et al., 1994). La présentation antigénique dans le contexte du CMH de classe II en absence des molécules B7 résulte en l'apoptose ou l'anergie des lymphocytes T (Harding et al.,

1992). D'autres signaux de costimulation facultatifs peuvent être utilisés pour activer les lymphocytes T et il s'agit de la molécule CD40, un récepteur de la famille des TNF qui est exprimée par les CPA et de son contre-ligand, CD40Ligand (CD40L), exprimé par les lymphocytes T. Les molécules d'adhérence et des intégrines participent aussi à la présentation antigénique, car elles permettent de stabiliser l'interaction entre les CPA et les lymphocytes T. En effet, les molécules d'adhérence de la superfamille des immunoglobulines, telles que *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1, exprimées par les CPA, se lie à l'intégrine *lymphocyte function-associated antigen* (LFA)-1 sur les lymphocytes T, lors de la présentation antigénique (Dang et al., 1990).

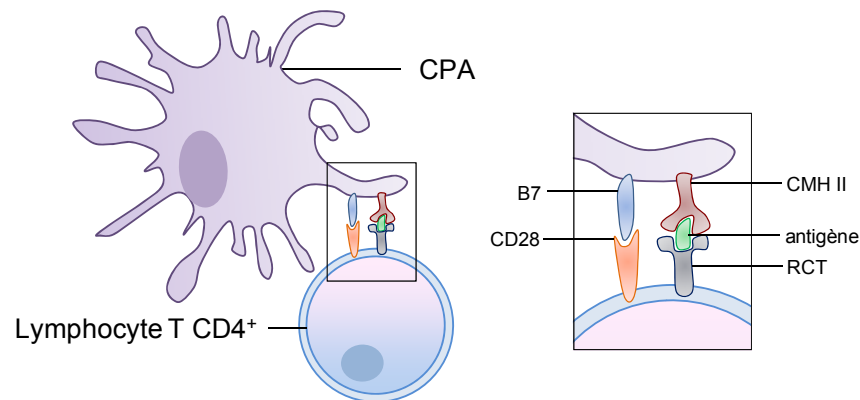


Schéma 2 : La présentation antigénique

L'activation et la prolifération des lymphocytes T_H nécessite la présence des CPA. Les CPA appréhendent l'antigène et le présentent par l'intermédiaire des molécules du CMH au complexe RCT-CD3. Les CPA présentent l'antigène dans le contexte du CMH de classe II aux lymphocytes T_H $CD4^+$. Cette interaction est suivie de signaux de costimulation B7 (B7-1/CD80 ou B7-2/CD86) des CPA aux récepteur CD28 exprimés par les lymphocytes T. Ces deux signaux activent les gènes permettant l'activation et la prolifération des lymphocytes T_H , la sécrétion de cytokines et l'augmentation de l'expression de différents récepteurs.

3.1 Les CPA non-professionnelles et professionnelles

Il existe deux types de CPA, soit les CPA non-professionnelles (cellules gliales et cellules épithéliales ou endothéliales (CE)) et les CPA professionnelles (DC, macrophages et lymphocytes B). Selon l'expression des molécules du CMH

et des molécules de costimulation, ces CPA ont différentes capacités de présentation antigénique et de costimulation. Les CPA professionnelles seront appelées CPA.

3.1.1 Les CPA non-professionnelles

Les CPA non-professionnelles, telles que les cellules gliales du cerveau (astrocytes et microglies) et les CE vasculaires, entres autres, peuvent exprimer les molécules du CMH de classe II et des molécules de costimulation dans certaines conditions inflammatoires (Wu and Laufer, 2007; Ransohoff et al., 2003). Par exemple, les CE de la BHE (CE-BHE) expriment les molécules du CMH de classe II et la molécule B7 suite à une stimulation par l'IFN- γ . Les astrocytes expriment également de hauts niveaux de CMH de classe II et de B7.1, lorsqu'activés avec l'IFN- γ (Nikcevich et al., 1997). Cependant, les astrocytes et les CE demeurent, même activés, des CPA non-professionnelles (Prat et al., 2000). Les microglies seront discutées à la **section 3.6**.

3.1.2 Les CPA professionnelles

Les CPA professionnelles (macrophages, DC et lymphocytes B) peuvent présenter l'antigène et envoyer des signaux de costimulation de façon efficace pour permettre l'activation complète des lymphocytes T. Les DC matures sont les CPA professionnelles les plus compétentes, car elles expriment constitutivement un taux élevé des molécules du CMH de classe II et elles ont une forte activité de costimulation leur permettant d'activer les lymphocytes T_H naïfs. Tandis que les macrophages peuvent seulement présenter l'antigène suite à leur activation par phagocytose lorsqu'ils expriment les molécules du CMH de classe II et de costimulation (Harding et al., 2003). Enfin, les lymphocytes B expriment constitutivement le CMH de classe II, cependant, afin d'exprimer les molécules de

costimulation, ils ont besoin d'être activés par des mécanismes dépendants ou indépendants des lymphocytes T.

3.2 Le rôle potentiel de la présentation antigénique dans la SEP et l'EAE

Lors du développement des lésions cérébrales inflammatoires chez les patients atteints de SEP et chez les souris atteintes d'EAE, la présentation antigénique permet l'activation des lymphocytes T qui sécrètent à leur tour différentes cytokines favorisant le recrutement et l'activation d'autres cellules et les éventuels dommages au SNC. Plusieurs évidences suggèrent que la présence de CPA au sein du SNC contribue directement au développement des lésions. D'abord, la région du CMH de classe II du génome humain contient les gènes *HLA-DR*, *-DP*, et *-DQ* et des études génétiques suggèrent l'implication du gène *HLA*, situé sur le chromosome 6, avec le développement de la SEP (Jersild et al., 1973). Ensuite, des études ont démontré qu'il existe une corrélation entre la présence de CPA et la démyélinisation dès le début de la formation des lésions de SEP (McCandless and Klein, 2007; Bruck et al., 1995). De plus, l'activation des lymphocytes T naïfs auto-réactifs et leur réactivation (au sein du SNC) sont cruciales pour le développement de la SEP et de l'EAE et dépend en grande partie de l'infiltration de CPA au sein du SNC (Ifergan et al., 2008; Greter et al., 2005; Bailey et al., 2007). Enfin, chez les souris atteintes d'EAE, la présence de CPA professionnelles au sein du SNC est importante pour l'initiation, la persistance et les phases récurrentes de la maladie (Lambert et al., 2008; McMahon et al., 2005). De plus, les souris déficientes pour le CMH de classe II (CMH II^{-/-}) sont résistantes à l'EAE (Stuve et al., 2002). Ces informations suggèrent que les interactions entre les lymphocytes et les CPA via le CMH de classe II et le RCT sont fortement impliquées dans la pathogénèse de la SEP (Wu and Laufer, 2007; Barcellos et al., 2006). Finalement, le rôle des cellules T CD8⁺ dans la formation des lésions en SEP est controversé. Alors que certaines études suggèrent un rôle important des cellules T CD8⁺ dans la formation des lésions de SEP (Saikali et al., 2007) et que les cellules CD8⁺ auto-réactives peuvent induire l'EAE (Saxena et al., 2008), les

animaux déficients dans certaines composantes du complexe du CMH de classe I sont plus vulnérables à l'EAE et développent une maladie plus sévère (Linker et al., 2005). Par ailleurs, certaines études suggèrent la participation des cellules T CD8⁺ au niveau du dommage tissulaire (Friese and Fugger, 2005), ce qui alimente la controverse au sujet du rôle exact des lymphocytes T cellules T CD8⁺ en SEP et en EAE.

3.3 Les monocytes

3.3.1 Généralités

Les monocytes sont des cellules mononucléaires phagocytaires circulantes provenant de la moelle osseuse et représentant de 5 à 10% des leucocytes sanguins, humains et murins (Seta and Kuwana, 2007). Les monocytes ont la capacité de se différencier en plusieurs cellules phagocytaires et sont les précurseurs des macrophages, des DC, des microglies, des ostéoclastes, des cellules de Langerhans et des cellules de Kupffer, entre autres, qui ont chacun des fonctions spécifiques (Geissmann et al., 2003). Les monocytes sont des cellules phagocytaires qui expriment des molécules d'adhérence et des récepteurs de chimiokines leur permettant de circuler dans le sang, la rate et dans différents organes (Geissmann et al., 2010; Auffray et al., 2009; Swirski et al., 2009). Les principaux rôles des monocytes sont de réapprovisionner les macrophages et les DC résidents au sein des tissus dans des conditions physiologiques, ainsi que de se rendre et de se différencier en CPA myéloïdes compétentes (macrophages ou DC) aux sites inflammatoires pour initier des réponses immunitaires (Leon and Ardavin, 2008). Les monocytes procurent aussi des bénéfices dans le tissu inflammé, car ils permettent de le « nettoyer », d'enlever les débris et de combattre certaines infections bactériennes, par exemple. Ainsi, les monocytes participent dans l'immunité innée et acquise. Il est intéressant de noter que les monocytes *ex vivo* ont une très faible capacité de présentation antigénique, car ils expriment

seulement les molécules du CMH de classe II et la molécule de costimulation B7-2/CD86 et ils n'expriment pas les autres molécules B7-1/CD80 et CD40 (Seguin et al., 2003a; Seguin et al., 2003b).

3.3.2 Les sous-populations et phénotypes des monocytes

Chez l'humain et la souris, il existe au moins deux sous-populations de monocytes. La majorité des monocytes, soit 95% chez l'humain et de 70 à 80% chez la souris, sont des monocytes « classiques » et ils sont reconnus par leur principal marqueur de surface CD14 chez l'humain et Ly-6C/Gr-1 chez la souris (Geissmann et al., 2003). Le marqueur CD14 fait parti du récepteur du lipopolysaccharide (LPS) des bactéries Gram négatives. Les monocytes « classiques » sont aussi appelés monocytes « inflammatoires », car ils sont recrutés aux sites inflammés où ils se différencient en macrophages ou en DC et ce grâce à l'expression de leurs différents récepteurs de chimiokines (Leon et al., 2005; Geissmann et al., 2003). D'ailleurs, les monocytes CD14⁺ expriment un faible niveau de CD16/FcγRIII et les monocytes Ly-6C/Gr-1⁺ sont CCR2⁺CD62L⁺CX3CR1^{lo}. L'expression de ces récepteurs de chimiokines et de cette sélectine permet aux monocytes de se rendre au site d'inflammation. L'autre sous-population regroupe le reste des monocytes qui sont reconnus par leur marqueur CD16⁺ et par une faible expression de CD14 chez l'humain (5%), et par Ly-6C/Gr-1⁻CCR2⁻CD62L⁻CX3CR1^{hi} chez la souris (20 à 30%) (Geissmann et al., 2003; Leon et al., 2005; Geissmann et al., 2003). Le récepteur du CX3CL1/Fractalkine, CX3CR1, permet aux monocytes Ly-6C/Gr-1⁻ de se rendre aux organes non-inflammés afin qu'ils se différencient en cellules résidentes. Chaque sous-population de monocytes est fonctionnellement équivalente entre l'humain et la souris, mais il y a des différences au niveau des molécules impliquées dans leur écotaxie et dans leur migration vers différents organes (Leon and Ardavin, 2008; Leon and Ardavin, 2008). Les monocytes d'intérêt qui seront considérés et étudiés dans ce mémoire sont les monocytes « classiques » ou « inflammatoires » CD14⁺.

3.3.3 Les monocytes dans le SEP et l'EAE

Lors de la formation des lésions inflammatoires au sein du SNC chez les patients atteints de SEP et les souris atteintes d'EAE, les monocytes se rendent au site inflammatoire, soit le SNC, et se différencient en macrophages ou en DC. Dans le sang de patients atteints de SEP, il y a une plus grande proportion de monocytes qui sécrètent les cytokines pro-inflammatoires IL-6 et IL-12, comparé aux monocytes de donneurs sains (Kouwenhoven et al., 2001). Ces cytokines sont importantes pour l'activation et la polarisation des lymphocytes T_H1 et T_H17, qui jouent de rôles importants dans la pathogenèse de la SEP. Chez les animaux atteints d'EAE, la présence de monocytes est très importante pour le développement de la maladie. En effet, Huitinga *et al.* et Tran *et al.* ont démontré que la déplétion systémique des monocytes résulte en l'absence d'infiltration périvasculaire de lymphocytes et une absence du développement de l'EAE (Huitinga et al., 1995; Tran et al., 1998). Ces résultats démontrent l'importance de la présence des monocytes, soit les précurseurs des CPA myéloïdes pour la présentation. Plus récemment, King *et al.* ont démontré qu'un enrichissement de la population des monocytes murins Ly-6C^{hi}, à l'aide de liposomes de clodronate, rend l'EAE plus sévère et ce comparé aux souris contrôles (King et al., 2009). Ainsi, plusieurs études illustrent l'importance de la présence de monocytes dans le développement de l'EAE.

Des études histopathologiques de matériel du SNC de patients atteints de SEP et d'animaux atteints d'EAE démontrent une augmentation de l'expression de certaines chimiokines telles que les chimiokines de type C-C (CCL)2/MCP-1, CCL3/ *macrophage inflammatory protein-1alpha* (MIP-1 α), le CCL5/RANTES et le ligand des chimiokines C-X-C (CXCL)10/ *inducible protein* (IP)-10 dans les cellules endothéliales (CE), les astrocytes et les infiltrats périvasculaires des lésions actives (Prat et al., 2002; Simpson et al., 1998; Van Der Voorn et al., 1999; Kennedy et al., 1998; Berman et al., 1996). La chimiokine CCL2/MCP-1, qui se lie aux récepteurs des chimiokines C-C (CCR)2 ou CCR4, est un facteur important pour le recrutement des monocytes et est une des principales chimiokines

sécrétée par les CE-BHE (Prat et al., 2002) et elle est également sécrétée par les astrocytes et les microglies. Il a été démontré par des études transgéniques chez des souris surexprimant CCL2/MCP-1 qu'il y a une augmentation de la transmigration des monocytes et de macrophages au sein du cerveau (Fuentes et al., 1995). Karpus *et al.* ont démontré que l'utilisation d'un anticorps bloquant CCL2/MCP-1, chez des souris atteintes d'EAE cyclique, diminue la sévérité de la maladie (Karpus and Kennedy, 1997). De plus, des souris déficientes pour le récepteur CCR2 (CCR2^{-/-}) ne développent pas l'EAE (Fife et al., 2000). Enfin, des études précliniques montrent que la neutralisation de CCR2 dans la SEP démontre une atténuation de la maladie (Luster et al., 2005; Izikson et al., 2002). Ici, l'importance du recrutement de monocytes au SNC est bien démontrée à l'aide d'études *in vitro*, *in vivo* et précliniques.

3.4 Les macrophages

3.4.1 Généralités

Les macrophages sont des cellules phagocytaires résidentes qui se trouvent dans les organes lymphoïdes et non lymphoïdes (Geissmann et al., 2010). Les précurseurs des macrophages sont les monocytes, tel que mentionné plus haut. Les macrophages jouent des rôles importants dans l'immunité innée et acquise et sont principalement responsables de l'élimination de débris et de cellules apoptotiques suite aux événements inflammatoires dans les différents organes. Les macrophages sont des CPA professionnelles qui sont importants pour la présentation antigénique et l'activation des lymphocytes T_H.

3.4.2 L'activation des macrophages

Le *macrophage colony-stimulating factor* (M-CSF) et l'IFN- γ permettent la différenciation des monocytes en macrophages et leur activation (Jager et al., 2009; Leon et al., 2005; Menetrier-Caux et al., 2001). L'IFN- γ , qui est principalement sécrété par les lymphocytes T_H1, est un des plus puissants activateurs de macrophages (Dalton et al., 1993). Le passage des monocytes à travers l'endothélium permet également leur différenciation en macrophages selon la présence de différentes cytokines présentes dans le microenvironnement cérébral ou qui sont sécrétées par différentes cellules. Enfin, suite à leur activation par phagocytose, les macrophages deviennent des CPA professionnelles qui expriment les molécules du CMH de classe II et les molécules de costimulation B7 (Harding et al., 2003). Étant donné qu'il y a une faible quantité de macrophages dans le sang périphérique, leur étude *in vitro* nécessite leur génération à partir de leur précurseur, soit les monocytes sanguins. Donc, l'activation *in vitro* des macrophages est nécessaire pour les différentes études impliquant les CPA. Suite à l'isolation de cellules mononucléaires du sang périphérique, ces dernières sont placées sur une surface en plastique pour qu'ils y adhèrent. Les cellules adhérentes représentent les monocytes, soit les précurseurs des macrophages et des DC (Seguin et al., 2003a). Après quelques jours de culture, sans l'ajout de cytokines exogènes, les monocytes se différencient en macrophages.

3.4.3 Les sous-populations et phénotypes des macrophages

Les macrophages sont reconnus par les marqueurs CD68⁺HLA-DR/CMH-II⁺ CD14⁺CD209/*dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin* (DC-SIGN)⁺ chez l'humain et CD45^{hi}CD11c⁻CD11b⁺F4/80⁺ chez la souris. Certains de ces marqueurs sont aussi exprimés par les microglies, mais le marqueur CD45 qui est faiblement exprimés à la surface des microglies murines (CD45^{lo}) permet de les différencier des macrophages. Les macrophages sont aussi divisés en deux sous-populations selon les récepteurs de chimiokines exprimés et selon leurs fonctions.

Les macrophages « inflammatoires » sont CCR2^{hi}CX3CR1^{lo} et se rendent au site d'inflammation pour participer à la réponse immune. Les macrophages « homéostatiques » expriment les marqueurs CCR2^{lo}CX3CR1^{hi} et ils représentent la population des macrophages résidents dans différents organes (Luster et al., 2005; Geissmann et al., 2003; Ancuta et al., 2003).

3.4.4 Les macrophages dans la SEP et l'EAE

Les macrophages sont aussi retrouvés dans le SNC des patients atteints de SEP et chez les souris atteintes d'EAE. Dans le SNC, les macrophages activés peuvent sécréter différents médiateurs proinflammatoires tels que le glutamate, les cytokines pro-inflammatoires *tumor necrosis factor-alpha* (TNF- α), l'IL-12, l'IL-1 et l'IL-6, des radicaux libres tels que l'oxyde nitrique et les métalloprotéinases de la matrice (MMP - *matrix metalloproteinases*) MMP-12 et -19 (Hendriks et al., 2005; Vos et al., 2003; van Horssen et al., 2006). Ces médiateurs pro-inflammatoires permettent l'activation et la prolifération de lymphocytes T, endommagent la matrice extracellulaire associée à la BHE et endommagent les axones dans le SNC. Des études ont démontré que du milieu conditionné par les macrophages, contenant du glutamate, est capable d'induire des dommages *in vitro* aux axones et aux neurones (Hendriks et al., 2005; Flavin et al., 1997; Piani and Fontana, 1994). Enfin les études de Huitinga *et al.* et de Tran *et al.* ont démontré que la déplétion systémique des monocytes, soit les précurseurs des macrophages et des DC, résulte en l'absence du développement de l'EAE (Huitinga et al., 1995; Tran et al., 1998).

3.5 Les cellules dendritiques

3.5.1 Généralités

Les cellules dendritiques (DC) sont des cellules migratoires dérivées de la moelle osseuse qui jouent des rôles importants dans l'immunité innée et acquise, ainsi que dans la tolérance immunitaire (Arjmandi et al., 2009; Chavarria and Alcocer-Varela, 2004; Guernonprez et al., 2002; Reis e Sousa, 2006). Tel que mentionné plus haut, les monocytes se différencient en DC (Leon and Ardavin, 2008). Les DC sont des CPA professionnelles demeurant dans les tissus de l'organisme ou dans les organes lymphoïdes secondaires (rate et ganglions lymphatiques) pour échantillonner leur environnement respectif, phagocyter les antigènes et subséquentment initier une réponse immunitaire lymphocytaire (Wu and Laufer, 2007).

3.5.2 Le développement et différenciation des DC

Dès que les DC rencontrent des antigènes, tels que des pathogènes, des débris cellulaires ou des produits bactériens, elles deviennent matures, ou activées et elles migrent vers les organes lymphoïdes secondaires pour présenter les antigènes et activer les lymphocytes T (Arjmandi et al., 2009). Dans leur état immature, les DC ont la capacité de phagocyter les antigènes et subséquentment initier une réponse immunitaire dans leur état mature (de Vos et al., 2002). La maturation des DC implique l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation, mentionnées plus haut, et l'apprêtement des antigènes suivi du transport des molécules du CMH à la surface membranaire. Ces changements donnent ainsi la capacité aux DC matures de présenter les antigènes au complexe RCT-CD3, de délivrer des signaux de costimulation et d'activer des lymphocytes T naïfs (Wu and Laufer, 2007). Les DC matures dérivés des monocytes ont la capacité de polariser les lymphocytes T_H $CD4^+$ vers une réponse T_H1 , T_H2 ou T_H17

(Leon and Ardavin, 2008; Leon and Ardavin, 2008). Ainsi, les DC permettent de faire le lien entre l'immunité innée et acquise, et permettent ainsi d'activer la réponse des lymphocytes T_H et d'initier d'autres réponses immunitaires (Palucka and Banchereau, 1999).

Le sang périphérique contient une faible quantité de DC, qui représentent 0,1% des leucocytes circulants et la plupart de ces DC circulantes sont immatures (Arjmandi et al., 2009; Wu and Liu, 2007). Ainsi, la majorité des études *in vitro* sont réalisées avec des DC générées à partir des monocytes du sang périphérique, soit les précurseurs des DC (Wu and Laufer, 2007). *In vitro*, la différenciation des monocytes en DC se fait en deux étapes et Sallusto et Lanzavecchia ont été les premiers à démontrer la capacité de générer des DC matures à partir de monocytes humains du sang périphérique (Sallusto and Lanzavecchia, 1994). Chez l'humain et la souris, les monocytes mis en culture avec le GM-CSF et l'IL-4 se différencient en DC immatures qui expriment de faibles niveaux du CMH de classe II et des molécules de costimulation (Leon et al., 2005; Sallusto and Lanzavecchia, 1994; Leon et al., 2004; Agger et al., 2000). La maturation des DC peut se faire en présence de LPS, de TNF- α , d'IFN- γ ou de CD40L, leur permettant ainsi d'augmenter l'expression des molécules du CMH de classe II et des molécules de costimulation (Leon et al., 2005; Ardavin et al., 2001). Dans le SNC, le GM-CSF peut être localement produit par les astrocytes et les lymphocytes T infiltrants (Lambert et al., 2008; Krasowska-Zoladek et al., 2007; Ponomarev et al., 2007). De plus, le GM-CSF permet la mobilisation des leucocytes de type myéloïde au site d'inflammation à partir de la moelle osseuse et ce dans un contexte inflammatoire (Hamilton, 2002). L'IL-4 est sécrétée par les lymphocytes T_H2 activés, les mastocytes et les basophiles et elle favorise le développement des DC en inhibant la production de M-CSF, importante pour la différenciation des monocytes en macrophages (Leon et al., 2005; Menetrier-Caux et al., 2001). Lors de la différenciation des DC, les récepteurs de chimiokines sont modulés de sorte à réguler leur écotaxie. Par exemple, l'expression de CCR7/CD197 augmente pour permettre aux DC de se rendre aux organes lymphoïdes secondaires, tandis que l'expression de récepteurs CCR1, CCR2 et CCR5 diminue pour empêcher la CPA de se rendre directement au site

d'inflammation (Arjmandi et al., 2009; Sallusto et al., 1998; Sozzani et al., 1998). Il est intéressant de noter que la génération de DC à partir de monocytes n'implique pas leur prolifération (Leon et al., 2005). La différenciation de monocytes en DC peut se faire sans l'ajout de cytokines exogènes, mais grâce à leur passage à travers l'endothélium vasculaire ou à travers l'épithélium (Muller and Randolph, 1999; Randolph et al., 1998). Ifergan *et al.* ont démontré que le passage de monocytes à travers des cultures primaires de CE-BHE, dans le modèle *in vitro* de la BHE (décrit dans la **section 4.2**), permet leur différenciation en DC (Ifergan et al., 2008) . En effet, une analyse plus approfondie a permise de démontrer que l'endothélium vasculaire sécrète différentes cytokines, telles que le TGF- β et le GM-CSF, qui sont importantes pour la génération des DC.

3.5.3 Les sous-populations et phénotypes des DC

Les DC matures sont reconnues par différents marqueurs et sont CD14⁻ HLA-DR/MHC-II⁺CD209/DC-SIGN⁺ chez l'humain et CD45^{hi}CD11c⁺ chez la souris. De plus, la morphologie des DC matures est modifiée et elles possèdent de longues extensions cytoplasmiques ressemblant aux dendrites, d'où leur nom. Les DC matures peuvent se différencier en deux sous-populations avec différents marqueurs et fonctions. Les DC myéloïdes (mDC) se différencient par les marqueurs CD11c⁺CD83⁺ chez l'humain et CD11c⁺CD11b⁺ chez la souris, tandis que les DC plasmacytoïdes (pDC) sont CD11c⁻CD123⁺ chez l'humain et CD11c⁺CD11b⁻B220⁺ chez la souris (Bailey-Bucktrout et al., 2008). Les mDC sécrètent de hauts niveaux d'IL-12 et favorisent l'expansion des lymphocytes pro-inflammatoires T_H1 et T_H17, selon les cytokines présentes dans le microenvironnement (Bailey et al., 2007; Cella et al., 1996; Macatonia et al., 1995; Jarrossay et al., 2001). Cependant, les pDC sécrètent l'IL-4 et l'IL-10 et favorisent l'expansion des lymphocytes T_H2 (Bailey-Bucktrout et al., 2008; Rissoan et al., 1999; Matsuda et al., 2002). Ainsi, les mDC et les pDC favorisent respectivement une réponse pro-inflammatoire T_H1 ou T_H17 et une réponse anti-inflammatoire T_H2.

3.5.4 Les DC dans la SEP et l'EAE

Lors de la formation des lésions inflammatoires cérébrales au sein du SNC chez les patients atteints de SEP, le nombre de DC est plus élevé, spécialement dans le LCR, et elles sont plus activées et ce comparé au DC des personnes saines (Wu and Laufer, 2007; Pashenkov et al., 2002). D'ailleurs, il y a moins de mDC CD83⁺ circulantes chez les patients atteints de SEP comparé aux contrôles sains (Lopez et al., 2006), suggérant qu'il y a un recrutement et une accumulation de mDC au SNC. La capacité des DC à activer et à réactiver les lymphocytes encéphalitogéniques est importante pour le maintien de la réponse immunitaire durant l'inflammation cérébrale dans le SNC des patients atteints de la SEP. Il a été suggéré que cette caractéristique des DC serait responsable de la chronicité de la maladie (Pashenkov et al., 2003). En effet, des lymphocytes T spécifiques aux peptides de la myéline isolées du SNC de souris atteintes d'EAE ainsi que les astrocytes et les cellules endothéliales produisent de niveaux élevés des chimiokines CCL2, CCL3 et CCL5, qui permettent d'attirer les DC immatures et les lymphocytes T_H (Miller et al., 2007; Bailey et al., 2007; Vecchi et al., 1999). D'ailleurs, ces DC immatures deviennent des DC matures lors de leur passage à travers l'endothélium et grâce à la présence de différentes cytokines et chimiokines dans ce microenvironnement et peuvent ainsi activer les cellules T. Il est intéressant de noter que Serafini *et al.* ont démontré que les DC sont les premiers leucocytes à être recrutés au sein du SNC durant l'initiation de l'EAE (Serafini et al., 2000; Karman et al., 2004). Une seconde observation intéressante faite par Serafini *et al.* porte sur la proximité entre les DC CD209/DC-SIGN⁺ et les lymphocytes T dans les lésions de SEP, suggérant l'importance de leur interaction physique et le rôle des DC dans la présentation antigénique et la réactivation des lymphocytes à l'intérieur du SNC (Arjmandi et al., 2009; Serafini et al., 2006; Karman et al., 2004). D'ailleurs, Greter *et al.* ont démontré que les mDC, dérivées des monocytes sanguins dans les souris atteintes d'EAE, migrent vers l'espace périvasculaire des lésions inflammatoires et sont suffisantes pour présenter les antigènes aux lymphocytes T auto-réactifs dirigés contre la myéline et pour ainsi initier la neuroinflammation et le développement de la maladie (Greter et al., 2005).

Enfin, les souris déficientes en GM-CSF (GM-CSF^{-/-}), c'est-à-dire qui ne peuvent pas développer de DC, et les souris saines traitées en présence d'anticorps neutralisant le GM-CSF sont résistantes à l'EAE (McQualter et al., 2001).

3.6 Les microglies

Les microglies sont les macrophages résidents du SNC, soit du cerveau et de la moelle épinière. Ces cellules gliales sont dérivées des cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse et lors du développement fœtal elles se dirigent vers le SNC où elles exerceront leur différentes fonctions, telles que phagocyter et présenter les antigènes (Rezaie and Male, 1999). Les microglies sont des CPA non-professionnelles et elles constituent 10% des cellules du parenchyme et sont la première ligne de défense du SNC (Becher et al., 2006). Dans des conditions inflammatoires dans le SNC, les microglies, qui sont les macrophages résidents du SNC, augmentent leur expression de surface des molécules du CMH de classe II et des molécules de costimulation, telles que B7-1/C80, B7-2/CD86 et CD40 (Streit and Graeber, 1993; Becher and Antel, 1996; Ulvestad et al., 1994; Aloisi, 2001). Les cellules microgliales activées ont d'ailleurs la capacité d'induire l'activation et la prolifération des lymphocytes T CD4, à des niveaux intermédiaires entre les CPA professionnelles et les astrocytes (Aloisi et al., 1998; Becher et al., 2006). Les microglies sont donc considérées comme des CPA partiellement compétentes. Il est intéressant de noter que Mildner *et al.* ont observé que lors de la fragilisation de la BHE, une repopulation des microglies au sein du SNC à lieu (Mildner et al., 2007).

Donc, la compréhension des mécanismes d'activation et d'actions des différentes sous-populations de lymphocytes T, de monocytes, de macrophages et de DC nous permettra de comprendre les mécanismes biologiques qui mènent à la formation des plaques en SEP et en EAE et d'identifier de nouvelles cibles thérapeutiques pour les différentes maladies inflammatoires du système nerveux.

4 - La barrière hémato-encéphalique

Le cerveau est un organe dit « immunologiquement privilégié ». Cet état est assuré, en partie, par la BHE qui restreint l'accès des cellules immunitaires circulantes, des molécules sanguines et de molécules hydrosolubles au sein du SNC, tout en contrôlant les échanges entre le sang et le SNC. Ainsi, la BHE protège le SNC et maintient un microenvironnement cérébral stable. Par contre, la BHE est semi-perméable, puisqu'elle permet l'acheminement des nutriments nécessaires au SNC grâce à différents transporteurs, tels que les transporteurs de glucose (*glucose transporter* (GLUT)-1) et les transporteurs d'acides aminés neutres (LAT1 - *large neutral amino acid transporter*) (Abbott et al., 2006). Des transporteurs sont aussi utilisés pour évacuer les métabolites toxiques du SNC. Le passage des molécules ou des cellules à travers la BHE peut se faire à travers les cellules endothéliales (transcellulaire) ou entre les cellules endothéliales (paracellulaire). Malgré l'accès limité des cellules immunitaires au SNC, certaines de ces cellules immunitaires, telles que des lymphocytes T cytotoxiques, doivent y avoir accès pour effectuer une surveillance immunitaire du cerveau et de la moelle épinière. Ces cellules patrouillent le parenchyme cérébral et interviennent pour contrôler différentes affections, comme les infections bactériennes ou virales, ainsi que le développement des tumeurs qui peuvent avoir lieu dans le SNC.

4.1 La régulation de la perméabilité de la BHE et phénotypes des CE-BHE

La BHE est formée de CE spécialisées reliées ensemble par un réseau complexe de protéines jonctionnelles, incluant les jonctions serrées (JS) et les jonctions adhérentes (JA). Dans le SNC, les CE-BHE sont aussi associées à la matrice extracellulaire (MEC) et aux astrocytes (**Schéma 3**).

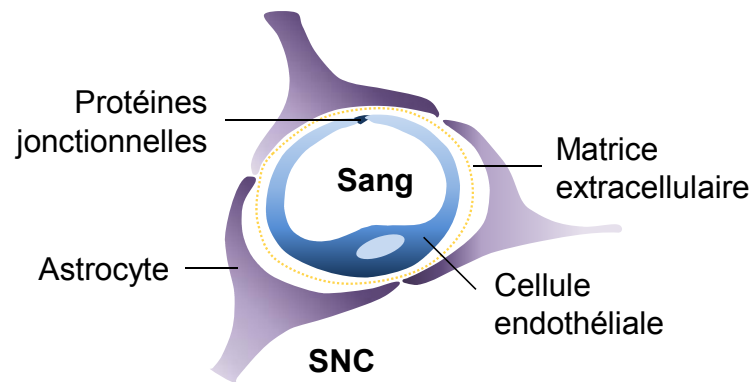


Schéma 3 : La barrière hémato-encéphalique

La BHE est formée de CE spécialisées reliées ensemble par un réseau complexe de protéines jonctionnelles (JS et JA). Les CE spécialisées n'ont pas de fenestrations, ont une activité pinocytotique très faible et elles possèdent des JS inhibant le passage transcellulaire de molécules à travers la BHE contribuant ainsi à son imperméabilité. Du côté abluminal de l'endothélium vasculaire de la BHE, les CE sont entourées et associées à une matrice extracellulaire (MEC), qui est à son tour entourée d'astrocytes qui sécrètent des facteurs solubles contribuant à l'étanchéité et aux propriétés d'imperméabilité de la BHE.

Les CE-BHE sont des CE spécialisées qui ne possèdent pas de fenestrations, ont une activité pinocytotique très faible et qui possèdent des JS inhibant le passage transcellulaire de molécules à travers la BHE, contribuant ainsi à son imperméabilité (Engelhardt and Sorokin, 2009). Les JS de la BHE restreignent et contrôlent le mouvement des molécules et des cellules entre la circulation systémique et le SNC.

Les CE-BHE sont identifiées grâce à différents marqueurs spécifiques, soit des molécules d'adhérence, des protéines jonctionnelles, des facteurs ou même des transporteurs. Par exemple, les marqueurs suivants sont utilisés pour confirmer l'identité des CE-BHE; *intercellular adhesion molecule* (ICAM)-1/CD54, *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1/CD106, *platelet/endothelial cell adhesion molecule* (PECAM)-1/CD31, *melanoma cell adhesion molecule* (MCAM)/CD146, Claudin-5, zona occludens (ZO)-1, GLUT-1, le facteur VIII, le facteur von Willebrand (vWF), *Ulex Agglutenens Europaensis* (UAE)-1-binding sites, l'antigène endothélial HT-7 et Caveolin-1. Aucun de ces marqueurs n'étant purement spécifiques aux cellules endothéliales cérébrales, leur utilisation

individuelle est inutile et tous ces marquages doivent être effectués simultanément pour confirmer l'identité des cellules.

4.1.1 Les jonctions serrées

Plusieurs types de protéines font partis du complexe des jonctions serrées (JS), soit les protéines transmembranaires (occludin, claudin et *junctional adhesion molecule* (JAM)) et les protéines cytoplasmiques (zona occludens (ZO), cingulin, AF-6 et 7H6) (Engelhardt and Sorokin, 2009; Hawkins and Davis, 2005; Wolburg and Lippoldt, 2002). Les protéines transmembranaires des JS se lient de façon homotypique avec leur contre-ligand sur la cellule adjacente et contribuent à l'imperméabilité de la BHE. Des études ont démontré que les protéines des JS essentielles pour empêcher le passage paracellulaire à travers la BHE sont occludin et claudin-5 (McCaffrey et al., 2007; Nitta et al., 2003; Harhaj and Antonetti, 2004; Huber et al., 2001). Les JAM (-A, -B, -C) sont des membres de la superfamille des immunoglobulines et peuvent médier une adhérence de type homophile ou hétérophilique (Stamatovic et al., 2008; Bazzoni and Dejana, 2004). JAM-A n'est pas seulement une molécule des JS, mais elle participe également à la transmigration de monocytes à travers les CE-BHE (Martin-Padura et al., 1998). Les protéines accessoires cytoplasmiques des JS, telles que cingulin, AF-6 7H6 et ZO (ZO-1, -2 et -3), permettent aux protéines transmembranaires des JS de s'ancrer au cytosquelette des CE-BHE.

4.1.2 Les jonctions adhérentes

Les jonctions adhérentes (JA) constituent un autre type de jonctions entre les CE-BHE. La principale JA est la cadhérine *Vascular endothelial* (VE-cadherin) qui médie aussi une interaction de type homophile (Dejana et al., 2008). Les protéines cytoplasmiques des JA sont les caténines (α -, β -, γ - et p120) (Stamatovic

et al., 2008; Nagafuchi, 2001). Des études ont démontré que les JA jouent des rôles dans les mécanismes initiaux de reconnaissance entre les CE et les leucocytes (Stamatovic et al., 2008; Nagafuchi, 2001; Rubin and Staddon, 1999; Ueno, 2007).

Ainsi, les protéines jonctionnelles des CE-BHE, soit les JS et les JA, sont primordiales pour conserver les propriétés d'imperméabilité et d'étanchéité de la BHE. Ces complexes protéiques empêchent le passage de certaines molécules et des leucocytes vers le SNC, à travers la BHE, pour garder un environnement cérébral stable.

4.1.3 La matrice extracellulaire

Les CE-BHE interagissent avec les protéines de la matrice extracellulaire (MEC) qui constituent la lame basale. La MEC se trouve du côté abluminal des CE-BHE et elle est composée de collagènes, de fibrilline, de laminine et de fibronectine (Man et al., 2007). Ces derniers jouent des rôles dans le SNC, tels que maintenir l'intégrité de la BHE et de la lame basale et favoriser les communications avec les astrocytes (van Horssen et al., 2007; Yurchenco and Schittny, 1990; Colognato and Yurchenco, 2000). La MEC contient certaines métalloprotéinases de la matrice (MMP - *matrix metalloproteinases*) qui sont des enzymes protéolytiques jouant des rôles dans la maintenance et le remodelage de la MEC. Dans des conditions inflammatoires du SNC, les lymphocytes T, les monocytes et les macrophages sécrètent de nombreuses MMP additionnelles, telles que MMP-1, -2, -9, et -12, qui dégradent la MEC et qui facilitent la transmigration des leucocytes au sein du SNC (Man et al., 2007; Lacraz et al., 1994; Sasaki et al., 2004).

4.1.4 Les astrocytes

Les CE-BHE interagissent également avec les astrocytes présents dans le SNC. En effet, les pieds astrocytaires englobent le côté basolatéral des CE-BHE. Les astrocytes sécrètent différents facteurs solubles qui contribuent à l'étanchéité et aux propriétés imperméables de la BHE, tels que TGF- β (Behzadian et al., 1995; Tran et al., 1999), *glial cell line-derived neurotrophic factor* (GDNF) (Igarashi et al., 1999; Utsumi et al., 2000), *vascular endothelial growth factor* (VEGF), *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) et Angiotensin II (Wosik et al., 2007). Ces derniers favorisent les propriétés d'imperméabilité de la BHE en favorisant l'expression de molécules des jonctions serrées (JS), décrites ci-dessus, diminuant ainsi la perméabilité paracellulaire entre les CE-BHE (Siddharthan et al., 2007). Il a été démontré que le milieu conditionné par les astrocytes (MCA), qui contient plusieurs facteurs solubles, diminue la perméabilité de la BHE dans un modèle *in vitro* de la BHE humaine, suite à la diminution de la diffusion de traceurs solubles à travers des CE-BHE (Siddharthan et al., 2007; Prat et al., 2001; Rubin et al., 1991). D'ailleurs, le MCA augmente l'expression de claudin-5, d'occludin et de ZO-1 dans les CE-BHE (Siddharthan et al., 2007).

4.2 Le modèle *in vitro* de la BHE

Le modèle *in vitro* de la BHE est grandement utilisé pour effectuer des études fonctionnelles au niveau de la BHE et ce grâce à la chambre de Boyden modifiée (**Schéma 4**). Dans la chambre du haut, une monocouche de CE-BHE est mise en culture sur une membrane poreuse, recouverte de gélatine ou de fibronectine pour mimer la MEC. De plus, le milieu de culture contient du milieu conditionné par les astrocytes (MCA) pour mimer l'environnement physiologique de la BHE. Pour réaliser des études de perméabilité des CE-BHE, des traceurs solubles, tels que le sucrose ou l'albumine de sérum bovin (BSA - *Bovine serum albumin*) conjugués, sont ajoutées dans la chambre du haut lors de la culture des CE-BHE. La diffusion du traceur soluble est mesurée dans la chambre du bas par

rapport à la chambre du haut (Prat et al., 2002). Des études de transmigration de différentes sous-populations de leucocytes peuvent être aussi effectuées dans ce même modèle *in vitro*. Sur une monocouche de CE-BHE confluentes, des leucocytes sont ajoutés à la chambre du haut et elles migrent dans la chambre du bas où elles sont quantifiées.

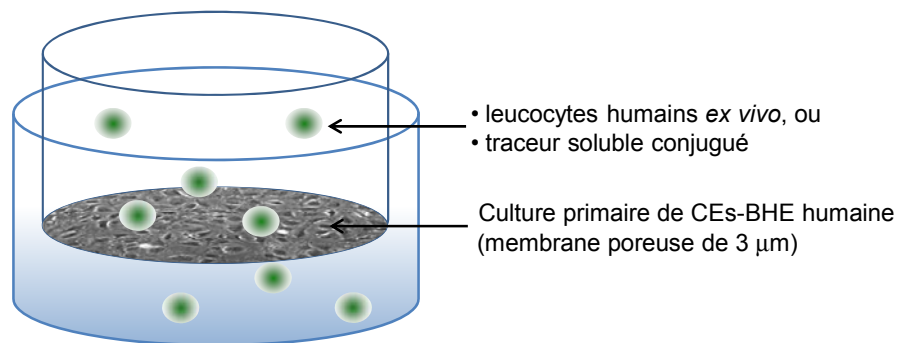


Schéma 4 : Le modèle *in vitro* de la barrière hémato-encéphalique humaine

Le modèle *in vitro* de la BHE est grandement utilisé pour effectuer des études fonctionnelles au niveau de la BHE à l'aide de la chambre de Boyden modifiée où une monocouche de CE-BHE est mise en culture sur une membrane poreuse. Ces CE sont mises en culture sur de la gélatine ou de la fibronectine pour mimer la MEC et le milieu de culture contient du MCA pour mimer l'environnement physiologique de la BHE. Pour réaliser des études de perméabilité ou d'imperméabilité des CE-BHE, des traceurs solubles conjugués sont ajoutés dans la chambre du haut, lors de la culture des CE-BHE et la diffusion du traceur soluble est mesurée dans la chambre du bas par rapport à la chambre du haut. Tandis que pour des études de transmigration, différentes sous-populations de leucocytes sont ajoutés à la chambre du haut, sur une monocouche de CE-BHE confluentes et elles migrent dans la chambre du bas où elles sont quantifiées.

4.3 La transmigration des leucocytes à travers la BHE

L'inflammation cérébrale altère l'imperméabilité de la BHE et rend le SNC accessible aux cellules du système immunitaire. Le recrutement de cellules immunitaires au sein du SNC est la principale caractéristique menant à l'inflammation cérébrale et à la formation de lésions en SEP. La transmigration des cellules immunitaires vers le SNC est orchestrée par différents facteurs, incluant l'interaction des sélectines et de leurs ligands, des chimiokines et de leurs récepteurs, des intégrines et des molécules d'adhérence endothéliales, des JS, des JA et des MMP (Man et al., 2007). Les mécanismes gérant la migration des

cellules immunitaires de la lignée lymphoïde ont été étudiés en détails, contrairement aux cellules de la lignée myéloïde (monocytes, macrophages et DC). En effet, plusieurs études mentionnées ci-dessus démontrent le rôle crucial des CPA myéloïdes dans les processus inflammatoires cérébraux. La transmigration des monocytes du sang au SNC est une étape importante dans le développement des lésions dans la SEP, l'EAE et d'autres maladies neuroinflammatoires.

Le recrutement des leucocytes dans le SNC, à travers la BHE, a lieu dans les capillaires et les veinules post capillaires (Man et al., 2007; Bechmann et al., 2007; Engelhardt and Ransohoff, 2005). Dans un contexte inflammatoire, les leucocytes se rendent au tissu inflammé pour effectuer leurs fonctions respectives et pour communiquer sur de courtes distances par contact direct ou par l'intermédiaire de cytokines (Luster et al., 2005). Il y a plusieurs étapes importantes pour qu'un leucocyte passe à travers la BHE. Ces étapes ont été décrites par Butcher, ainsi que par Dustin et Springer en 1991 (Owens et al., 2008; Butcher, 1991; Dustin and Springer, 1991). Ley *et al.* ont également décrit d'autres étapes complémentaires (Ley et al., 2007) entre les quatre étapes classiques et séquentielles qui sont le plus utilisées. Les quatre étapes essentielles pour la transmigration des leucocytes au sein du SNC sont : 1- le roulement du leucocyte, 2- l'activation des intégrines leucocytaire par les chimiokines, 3- l'arrêt et l'adhérence ferme du leucocyte sur les CE-BHE et 4- la diapédèse du leucocyte à travers la BHE (**Schéma 5**). Brièvement, le roulement du leucocyte s'effectue grâce à l'interaction entre des sélectines et leurs contre-ligands exprimés par les lymphocytes et les monocytes (Luster et al., 2005; McEver, 2002). Ensuite, l'activation des intégrines leucocytaires a lieu grâce aux différentes chimiokines sécrétées par les CE-BHE. L'activation des intégrines change leurs conformation et permet leur interaction avec leurs ligands, soit les molécules d'adhérence cellulaire (CAM - *cellular adhesion molecules*) et ainsi l'arrêt et l'adhérence ferme du leucocyte sur l'endothélium a lieu. La dernière étape de la transmigration leucocytaire est la diapédèse qui consiste au passage des leucocytes à travers les CE-BHE au sein du SNC. Cette étape s'effectue à l'aide d'interactions entre différentes molécules d'adhérence et protéines jonctionnelles. Les quatre étapes

générales de la transmigration des leucocytes à travers la BHE sont similaires à celles qui sont observées dans les autres vaisseaux sanguins, mais les molécules et les protéines impliquées sont différentes, telles que les molécules des jonctions serrées des CE-BHE.

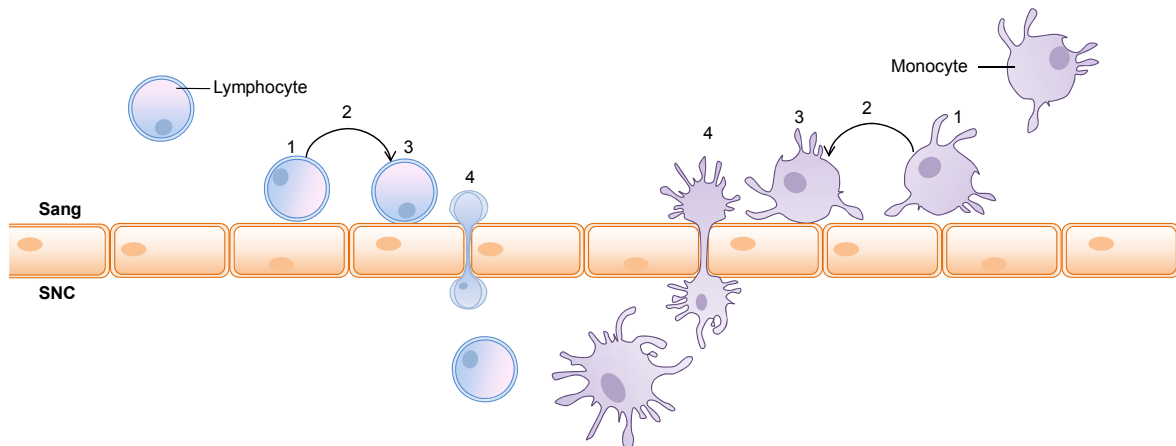


Schéma 5 : La transmigration de leucocytes au SNC à travers la BHE

La transmigration et l'entrée des cellules immunitaires dans le SNC sont orchestrées par différents facteurs, incluant l'interaction des sélectines et de leurs ligands, des chimiokines et de leurs récepteurs, des intégrines et des molécules d'adhérence endothéliales, des JS, JA et des MMP (Man et al., 2007). Il y a plusieurs étapes importantes dans la transmigration des leucocytes de la périphérie vers le SNC. Le leucocyte ralentit pour échantillonner l'endothélium et roule grâce à ses sélectines à la recherche de ses ligands sur les CE (1). Ensuite, les chimiokines sécrétées par les CE-BHE activent les intégrines en changeant leur conformation (2). Le Leucocyte vient à un arrêt sur l'endothélium grâce à la forte interaction entre les intégrines et les molécules d'adhérence cellulaire (CAM - *cellular adhesion molecules*) (3). La dernière étape est la diapédèse du leucocyte à travers la BHE qui se fait à l'aide de différentes protéines dont les CAM les protéines des JS et des JA et des MMP qui facilitent le passage du leucocyte (4). Les monocytes et les lymphocytes utilisent ces mêmes étapes pour transmigrier, mais grâce à des molécules d'adhérence, des chimiokines, des récepteurs de chimiokines, des intégrines et des CAM différents.

4.4 L'intégrité de la BHE dans la SEP et l'EAE

Chez les patients atteints de SEP et chez les souris atteintes d'EAE, certains médiateurs pro-inflammatoires, tels que l'IL-1 β , le TNF- α , l'IFN- γ , les chimiokines CCL2/MCP-1 et CXCL8/IL-8, les MMP-2 et -9, jouent leur rôle en augmentant la perméabilité de la BHE (Stamatovic et al., 2008; Abbott, 2000; Argaw et al., 2006; Dimitrijevic et al., 2006; Stamatovic et al., 2005; Huber et al.,

2001; Mark and Miller, 1999; Sonobe et al., 2009; Gloor et al., 1997). La cytokine pro-inflammatoire TNF- α est sécrétée par plusieurs cellules immunitaires dont les lymphocytes T et B, les macrophages et les cellules NK. Cette cytokine est importante dans la fragilisation de la BHE, jouant ainsi un rôle dans la progression de la SEP et de l'EAE (Silwedel and Forster, 2006; Minagar and Alexander, 2003). En effet, Förster *et al.* ont démontré que TNF- α inhibe l'expression d'occludin et de claudin-5 des CE-BHE (Forster et al., 2008). Wong *et al.* avaient en effet suggéré que la migration des leucocytes est temporairement associée à une augmentation de la perméabilité des CE-BHE (Wong et al., 2007). En présence de médiateurs pro-inflammatoires, telles les cytokines IFN- γ ou TNF, et le LPS, l'expression des molécules d'adhérence ICAM-1, VCAM-1 et PECAM-1 est augmentée à la surface membranaire des CE-BHE (Wong et al., 2007; Wong and Dorovini-Zis, 1992; Wong and Dorovini-Zis, 1995; Wong and Dorovini-Zis, 1996). Des études ont démontré que le TNF- α , l'IFN- γ et l'IL-1 β augmentent significativement la migration des leucocytes à travers la BHE, dont les lymphocytes T, par la diminution de l'expression d'occludin et de l'augmentation éventuelle de la perméabilité des CE-BHE (Sonobe et al., 2009; Hart and Fabry, 1995; Afonso et al., 2007). D'ailleurs, Kébir et al, ont démontré que l'IL-17 et l'IL-22, sécrétées par les lymphocytes T_H17, diminuent l'expression de ZO-1 et d'occludin dans les CE-BHE favorisant ainsi l'infiltration des lymphocytes T_H inflammatoires au sein du SNC (Kébir et al., 2007).

La fragilisation de la BHE et la perte de son intégrité sont aussi impliquées dans d'autres maladies neurologiques, telle que la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, les accidents cérébrovasculaires, le virus de l'immunodéficience humaine (VIH)-1 et la sclérose latérale amyotrophique (Sonobe et al., 2009; Zhong et al., 2008; Zlokovic, 2008).

5 - Ninjurin-1

Suite à une analyse par protéomique des protéines associées à la BHE humaine, plusieurs molécules ont été détectées dans les cultures primaires de CE-BHE (Cayrol et al., 2008) . Plus spécifiquement, de nombreuses molécules d'adhérence potentiellement impliquées dans la transmigration des leucocytes à travers la BHE ont été identifiées. Parmi ces dernières, *Nerve injury-induced protein* (Ninjurin)-1 a attiré notre attention puisqu'elle fait l'objet de très peu d'étude et que son rôle dans les pathologies inflammatoires du SNC n'est pas encore décrit.

5.1 Généralités

Ninjurin-1 est une nouvelle molécule d'adhérence qui a été identifiée chez le rat, par Araki et Milbrandt en 1996, dans une analyse génétique identifiant des gènes dont l'expression augmente suite à une lésion nerveuse périphérique. Le nom de cette molécule d'adhérence, *nerve injury-induced protein-1*, illustre son profil d'expression dans les fibres nerveuses où elle a été préalablement identifiée. Araki et Milbrandt ont démontré une importante augmentation de l'expression de Ninjurin-1 sur les cellules de Schwann et sur les neurones suite à une lésion nerveuse périphérique, avec un pic d'expression qui a lieu entre les 7 à 14 jours suivant la lésion du nerf sciatique du rat (Araki and Milbrandt, 1996). Suite à cette lésion, Ninjurin-1 est transportée à travers l'axone et s'accumule au site de lésion nerveuse. Ainsi, cette molécule d'adhérence facilite la régénération axonale en favorisant l'extension axonale via des interactions de type homophile (Ninjurin-1-Ninjurin-1) entre les axones neuronales et les cellules de Schwann dans le système nerveux périphérique (SNP) (Araki and Milbrandt, 1996).

Ninjurin-1 est une protéine de 152 acides aminés (aa) qui a un poids moléculaire situé entre 18 et 22 kilo Dalton (kDa). Cette molécule d'adhérence, qui

n'a aucune similarité avec d'autres protéines, est localisée sur le chromosome 9, chez l'humain et sur le chromosome 13 chez la souris (Araki and Milbrandt, 1996; Chadwick et al., 1998). Ninjurin-1 contient deux régions transmembranaires (séquences humaines; aa 81 à 101 et aa 121 à 141) et deux régions extracellulaires (Amino-terminale (N-terminale) : aa 1 à 80; et Carboxy-terminale (C-terminale) : aa 142 à 152) (**Schéma 6a**). Les études préliminaires d'Araki et Milbrandt ont prédit que Ninjurin-1 est une molécule d'adhérence de surface de type 3b selon la classification de Singer, puisqu'elle contient deux régions transmembranaires et sa portion N-terminale se situe à l'extérieur de la cellule (Singer, 1990). Araki *et al.* ont démontré que Ninjurin-1 est exprimée dans différents organes embryonnaires et adultes, tels que le foie, le rein, le thymus, les glandes surrénales, le cœur, la rate, l'utérus et la rétine, alors qu'elle est exprimée à de faibles niveaux dans le cerveau et les neurones (Araki and Milbrandt, 1996; Araki et al., 1997). Selon Araki et Milbrandt, son expression dans le tissu embryonnaire et adulte suggère que Ninjurin-1 joue un rôle dans le développement et le maintien des tissus (Araki and Milbrandt, 1996).

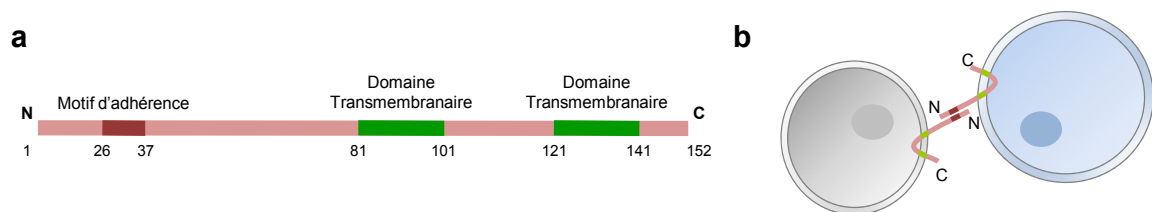


Schéma 6 : Ninjurin-1

(a) Ninjurin-1 est une protéine de 152 aa qui contient deux régions transmembranaires (séquences humaines; aa 81 à 101 et aa 121 à 141) et deux régions extracellulaires (N-terminale : aa 1 à 80; et C-terminale : aa 142 à 152). Ninjurin-1 est une molécule d'adhérence de surface de type 3b, selon la classification de Singer, puisqu'elle contient deux régions transmembranaires avec la portion N-terminale à l'extérieur de la cellule (Singer, 1990). Ninjurin-1 contient un motif d'adhérence (aa : 26 à 37) situé dans la région extracellulaire N-terminale (aa 1 à 80). (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.

Suite à l'identification de Ninjurin-2 par Araki et Milbrandt, la famille des protéines Ninjurin fut créée. Cette molécule d'adhérence contient aussi 142 aa, avec 55% d'homologie avec Ninjurin-1 (Araki and Milbrandt, 2000). Ninjurin-2 médie aussi une adhérence de type homophile et son expression augmente

dans les cellules de Schwann et elle favorise la régénération axonale, comme Ninjurin-1. Par contre, Ninjurin-1 et Ninjurin-2 n'interagissent pas ensemble. Enfin, Ninjurin-2 est principalement exprimée dans les organes lymphatiques et hématopoïétiques (Araki and Milbrandt, 2000).

5.2 L'adhérence homophile médiée par Ninjurin-1

Ninjurin-1 a la capacité de médier une adhérence de type homophile et elle peut donc se lier à une autre molécule Ninjurin-1 sur une cellule adjacente (**Schéma 6b**). Cette observation a été faite suite à des tests d'agrégations des cellules T Jurkat transfectées avec des vecteurs exprimant Ninjurin-1. Des études ultérieures d'Araki *et al.* ont permis de caractériser l'adhérence homophile médiée par Ninjurin-1 (Araki et al., 1997). En effet, ils ont découvert que le motif d'adhérence de Ninjurin-1, qui est important pour l'adhérence homophile, est situé dans la région N-terminale extracellulaire située entre les aa 1 à 80. Ces études *in vitro* ont été effectuées en inhibant l'agrégation des cellules Jurkat avec différents peptides synthétiques pour identifier la séquence essentielle pour l'interaction homophile médiée par Ninjurin-1. Cette séquence a été trouvée, chez le rat, et elle contient 12 aa situés entre les aa 26 à 37 (**Schéma 6a**; séquence du rat : PPRWGLRNRPIN; séquence de humaine : PARWGWRHGPIIN) et la concentration nécessaire pour complètement inhiber l'agrégation est de 0,4 millimolaire (mM) (Araki et al., 1997). Également, ils ont suggéré que la fonction biologique de Ninjurin-1 est probablement associée à ses propriétés d'adhérence. Cela a été déterminé par l'inhibition de la régénération axonale, généralement médiée par Ninjurin-1, en présence du peptide synthétique identifié préalablement (Araki et al., 1997). De plus, Jerregård a observé que l'adhérence homophile médiée par Ninjurin-1, entre les neurones de ganglions de la racine dorsale et les fibroblastes dérivés de la peau, est importante pour la survie et la croissance des neurones (Jerregård, 2001). Aucun autre ligand pour Ninjurin-1 n'a été identifié à date. Ceci n'exclut cependant pas une interaction de type hétérophilique de Ninjurin-1 avec une autre protéine. Finalement, aucune étude ne démontre qu'un

anticorps ou un peptide synthétique neutralisant pouvait inhiber la fonction de Ninjurin-1 *in vivo*.

5.3 Ninjurin-1 chez différentes espèces

Chadwick *et al.* ont cartographié le gène humain *ninjurin-1* sur le chromosome 9q22 (Chadwick *et al.*, 1998). L'homologie des 80 premiers aa, soit la région extracellulaire N-terminale, entre la séquence humaine et murine est de 84%. Tandis que la séquence protéique de Ninjurin-1 chez le rat est à 89% similaire avec la séquence humaine et à 98% similaire avec la séquence murine de Ninjurin-1 (Chadwick *et al.*, 1998). Kim *et al.* ont suggéré que la similitude des séquences de Ninjurin-1 entre le rat, la souris et l'humain signifie que la fonction de Ninjurin-1 a probablement été conservée entre différentes espèces (Kim *et al.*, 2001)

L'homologue de Ninjurin-1 chez la drosophile est Ninjurin A (NijA), une molécule d'adhérence qui est aussi une protéine transmembranaire (Zhang *et al.*, 2006). Suite à l'observation de la co-localisation de NijA et de la métalloprotéinase MMP-1, dans les cellules de la trachée des larves de drosophiles, Zhang *et al.* ont démontré que cette enzyme clive NijA et libère son domaine extracellulaire. Ce clivage cause la perte de l'adhérence des cellules de la trachée du cuticule et NijA permet ainsi le développement trachéal des drosophiles.

5.4 Ninjurin-1 et l'inflammation

Plusieurs études génétiques, réalisées dans un contexte inflammatoire, incluant l'EAE, ont été effectuées pour étudier la régulation de plusieurs gènes dont *ninjurin-1*. Paglinawan *et al.* ont observé une augmentation de *ninjurin-1* dans des cultures primaires de microglies murines après un traitement en présence des

cytokines pro-inflammatoires TNF- α et IFN- γ et une diminution après un traitement en présence de la cytokine TGF- β 2 (Paglinawan et al., 2003). Une analyse génotypique par affimatrix effectuée par Carmody *et al.* a démontré l'augmentation de l'expression de *ninjurin-1* dans la moelle épinière des souris de la souche C57BL/6 atteintes d'EAE suite à une immunisation avec le peptide MOG₃₈₋₅₀ et ce comparé aux souris naïves (Carmody et al., 2002).

5.5 Les maladies impliquant *Ninjurin-1*

La présence de *Ninjurin-1* est associée à différentes maladies. Les études d'Araki *et al.* ont démontré que l'expression de *Ninjurin-1* est très élevée dans le foie, mais son rôle dans les hépatocytes est inconnu (Araki et al., 1997). *Ninjurin-1* est surexprimée dans les hépatomes humains, ce qui augmente l'expression de la protéine p21 et induit la sénescence cellulaire (Toyama et al., 2004). *Ninjurin-1* est aussi surexprimée dans le tissu des patients atteints de cancer primitif du foie associé à une hépatite ou une cirrhose virale chronique (Kim et al., 2001). Finalement, *Ninjurin-1* a aussi été associée à la leucémie aiguë lymphoblastique, car son expression augmente dramatiquement dans les cellules B leucémiques, comparé aux cellules B des donneurs sains (Chen et al., 2001). Ainsi, l'augmentation de l'expression de *Ninjurin-1* serait associée à plusieurs maladies, telles que l'hépatome, l'hépatite ou la cirrhose virale chronique et la leucémie aiguë lymphoblastique.

HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS

L'hypothèse de ce mémoire est que *Nerve injury-induced protein* (Ninjurin)-1 est une nouvelle molécule d'adhérence de la barrière hémato-encéphalique (BHE) impliquée dans le recrutement des leucocytes au système nerveux central (SNC).

Pour répondre à cette hypothèse, six objectifs spécifiques ont été fixés :

- 1) De caractériser l'expression, la régulation et la localisation de Ninjurin-1 au niveau des cellules endothéliales de la BHE (CE-BHE) humaines *in vitro* et *in situ*.
- 2) De caractériser l'expression de Ninjurin-1 sur différentes cellules immunitaires humaines et murines, *ex vivo*, *in vitro* et *in situ*; provenant de donneurs humains sains et provenant de matériel *post-mortem* du SNC de patients atteints de sclérose en plaques (SEP) et de souris atteintes d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE).
- 3) D'évaluer si Ninjurin-1 joue un rôle au niveau de la transmigration de leucocytes à travers les CE-BHE.
- 4) De déterminer si Ninjurin-1 participe à l'imperméabilité des CE-BHE.
- 5) D'évaluer si Ninjurin-1 joue un rôle dans la présentation antigénique, ainsi que dans l'activation et la prolifération des lymphocytes T.
- 6) D'identifier le rôle de Ninjurin-1 dans le recrutement des leucocytes dans le modèle murin de la SEP, la souris atteinte d'EAE.

MATÉRIELS ET MÉTHODES

1. Isolation et culture de cellules endothéliales de la BHE humaine

Les cellules endothéliales de la barrière hémato-encéphalique (CE-BHE) humaine ont été isolées à partir de matériel non-épileptique selon un protocole déjà établi (Ifergan et al., 2008). Le consentement éclairé du patient et l'approbation éthique ont été obtenus avant la chirurgie (Numéro d'approbation du comité d'éthique de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal : HD04.046). Les CE-BHE ont été maintenues en culture primaire dans du milieu composé du Medium 199 (Invitrogen) enrichi avec 20% de milieu conditionné par les cellules d'un mélanome murin (clone M3, ATCC), 10% de sérum de bovin fœtal (SBF ; Gibco), 5% de sérum humain (SH ; Gibco), 0,2% de supplément de croissance pour les CE (ECGS - *endothelial cell growth supplement* ; BD Biosciences) et 0,13% d'*insulin-selenium-transferrin premix* (Sigma) dans des flasques de culture en plastique induits avec 0,5% de gélatine (Sigma). Les CE-BHE ont été mises en culture jusqu'à confluence dans du milieu de culture supplémenté avec 40% de milieu conditionné par les astrocytes (MCA). Lorsqu'indiqué, les CE-BHE ont été activées pendant 24 heures avec 100 U/ml de *Tumor Necrosis Factor* (TNF) et 100 U/ml d'interféron (IFN)- γ (Invitrogen), en présence de 40% de MCA et en absence d'ECGS. Des analyses de caractérisation des CE-BHE ont préalablement été effectuées pour confirmer la pureté des cultures primaires de CE-BHE. Les CE-BHE expriment les marqueurs de CE suivants: le facteur VIII, le facteur von Willebrand, *Ulex Agglutens Europaensis-1-binding sites* et l'antigène *endothelial HT-7* (Cayrol et al., 2008; Ifergan et al., 2008). De plus, les CE-BHE sont aussi susceptibles à une augmentation de l'expression d'*intracellular cell adhesion molecule* (ICAM)-1 et de *vascular cell adhesion molecule* (VCAM)-1, deux molécules d'adhérence surexprimées en présence de la cytokine pro-inflammatoire TNF. L'absence de contamination des cultures primaires de CE-BHE par les astrocytes et les cellules musculaires souples a été confirmée par l'absence d'immunoréactivité des marqueurs *glial fibrillary acidic protein* (GFAP) et *alpha-myosin* respectivement (Cayrol et al., 2008; Ifergan et al., 2008).

2. Culture d'astrocytes

Les astrocytes proviennent du laboratoire du Dr. Jack Antel de l'Institut Neurologique de Montréal (Université McGill, Montréal, Québec). Les astrocytes humains primaires ont été mis en culture dans un milieu composé de *Dulbecco's Modified Eagle Medium* (DMEM, Invitrogen) et supplémenté avec 10% de SBF, 1% de pénicilline/streptomycine (Gibco) et 1% de glutamine (Gibco). Les astrocytes ont été mis en culture dans des flasques en plastique. Le milieu conditionné par les astrocytes (MCA) a été récolté 1 fois par semaine à partir de flasques confluents et a été utilisé dans les cultures de CE-BHE lorsqu'indiqué.

3. Isolation et culture de leucocytes

Des échantillons de sang veineux de donneurs sains et consentants ont été obtenus en accord avec les directives institutionnelles (Numéro d'approbation du comité d'éthique de recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal : SL05.022 et SL05.023). Les cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC - *peripheral blood mononuclear cells*) ont été isolées grâce à un gradient de densité obtenu suite à une centrifugation de 30 min à 1800 rotations par minute (rpm) en utilisant le Ficoll-Paque™ PLUS (GE Healthcare). Les cellules *ex vivo* CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ et CD19⁺ ont été isolées par sélection positive à partir des PBMC à l'aide des microbilles magnétiques respectives (MicroBeads, Miltenyi Biotec Inc.). Pour générer des macrophages et des cellules dendritiques (DC) matures, les PBMC ont initialement eu la chance de s'adhérer dans des flasques en plastique, pendant 2 h à 37°C dans du RPMI 1640 (Wisent Inc.) supplémenté avec 5% de SH, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de glutamine pour isoler les monocytes (Seguin et al., 2003a). Ensuite, le milieu a été remplacé avec du milieu frais pour enlever les cellules non adhérentes. Pour la génération de macrophages, les cellules adhérentes ont été récoltées après 8 jours de culture pour l'analyse. Tandis que pour la génération de DC, le milieu de culture a été supplémenté avec 20 ng/ml de *Granulocyte macrophage colony-stimulating factor* (GM-CSF, BD Biosciences) et 10 ng/ml d'*interleukine* (IL)-4 recombinante humaine

(R&D Systems). La moitié du milieu de culture a été remplacée à chaque 2 jours avec du milieu frais contenant du GM-CSF et de l'IL-4. Après 7 jours de culture, 100 ng/ml de lipopolysaccharide (LPS) d'*Escherichia coli* (Sérotype 0111:B4 ; Sigma) ont été ajoutés et les DC matures ont été récoltées après 2 jours pour l'analyse.

4. Cytométrie de flux

Les CE-BHE ou les PBMC ont été récoltées et resuspendues dans du tampon de cytométrie de flux constitué de tampon phosphate salin (PBS : *phosphate buffered saline*) supplémenté avec 1% de SBF et 0,1% de NaN₃ et elles ont été incubées durant 15 min à 4°C avec 10% de SH pour éviter l'attachement non-spécifique des anticorps. Les CE-BHE ou les PBMC humaines ont été incubées pendant 1 h à 4°C avec l'anticorps primaire monoclonal murin anti-Ninjurin-1 (20 µg/ml, BD Biosciences) ou avec le contrôle isotypique murin IgG2a (20 µg/ml, eBioscience). Suite à un lavage, les cellules ont été incubées pendant 30 min à 4°C avec l'anticorps secondaire chèvre anti-souris conjugué avec l'allophycocyanine (APC) (2 µg/ml, BD Biosciences). Les cellules lavées ont été immunocolorées pendant 30 min à 4°C en présence d'anticorps murins anti-humain conjugués CD3, CD4, CD8, CD11c, CD14, CD19, CD45RO, CD68, CD83, *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin* (DC-SIGN)/CD209, complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) I, CMH II, ICAM-1, VCAM-1 ou avec leurs contrôles isotypiques correspondants (tous les anticorps sont de BD Biosciences). L'acquisition des cellules a été faite à l'aide du cytomètre de flux BD LSR II à l'aide du logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences).

5. Immunobuvardage

Des leucocytes humains *ex vivo* (CD4⁺, CD8⁺, CD14⁺ et CD19⁺), ou des CE-BHE de cultures primaires humaines ou du matériel du SNC de souris naïves (contrôles) et atteintes d'EAE ont été analysés par immunobuvardage. Les cellules ont été lysées dans du tampon dénaturant (0,1% de *sodium dodecyl sulfate* (SDS) dans 50 mM de Tris-HCl pH 8,5) contenant un cocktail d'inhibiteurs de protéinases (BD BaculoGold™, BD Biosciences) et elles ont été soniquées à l'aide du processeur ultrasonique de Vibra Cell™ (Sonics & Materials Inc). Ensuite, les protéines ont été quantifiées par dosage colorimétrique à l'aide du kit: *Bicinchoninic acid* (BCA)™ Protein Assay kit (Pierce Biotechnology) selon les instructions du manufacturier. Vingt µg de protéines ont été séparées par électrophorèse sur un gel de *SDS-polyacrylamide gel electrophoresis* (SDS-PAGE) de 12% et ont été transférées vers une membrane Immun-Blot™ de *Polyvinylidene fluoride* (PVDF, Bio-Rad Laboratories). Les membranes ont été bloquées avec 5% de sérum d'âne (Sigma) ou avec 5% de lait en poudre sans gras, dilué dans du *Tris-buffered saline* (TBS) avec 0,1% de Tween 20 (Sigma) pendant 1 h à température ambiante (TA). Les incubations ont été effectuées pendant 16 h à 4°C avec l'anticorps primaire mouton anti-Ninjurin-1 (1:100; R&D Systems) ou avec l'anticorps primaire monoclonal murin anti-Ninjurin-1 (1:150; BD Biosciences). Les anticorps primaires ont été détectés avec la peroxydase conjuguée âne anti-mouton IgG (donkey anti-sheep IgG) (H+L) (1:7500; Jackson ImmunoResearch) ou avec la peroxydase conjuguée lapin anti-souris (1:1000; DakoCytomation). L'agent luminescent *Enhanced Chemiluminescence (ECL)™ western blotting analysis system* (Amersham™ GE Healthcare) a été utilisé pour dévoiler l'attachement spécifique des anticorps. L'anticorps murin anti-β-actin (1:20 000; Sigma) a été utilisé comme contrôle interne de chargement. Le lysat cellulaire de cellules HepG2 (BD Biosciences) a été utilisé en tant que contrôle positif pour l'expression de Ninjurin-1.

6. Isolation et analyse des radeaux lipidiques

Les radeaux lipidiques (RL) ont été isolés à partir de plusieurs flasques de cultures primaires de CE-BHE confluentes. Les CE-BHE ont été mises en cultures et traitées tel que décrit ci-dessus. Les cellules ont été lavées avec du PBS froid et récoltées avec des grattoirs à cellules (Sarstedt) à partir des flasques confluentes. Suite à une centrifugation, les cellules ont été resuspendues dans 1ml d'une solution de 1% de détergent brij58 (Sigma) dans du tampon de séparation (150 mM de NaCl, 25 mM de Tris-HCl pH 7,4) en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéinases (BD BaculoGold™, BD Biosciences) et les cellules ont été solubilisées pendant 30 min sur glace. Les lysats cellulaires ont été transférés dans un homogénéisateur en verre de Dounce muni d'un piston à espace large et ont ensuite été mélangés avec 1ml d'une solution de sucrose 85% (Sigma) dans du tampon de séparation pour obtenir une concentration finale de sucrose à 42,5% et mis dans un tube en plastique de centrifugation (Beckman). À ce volume, 6ml de sucrose 35% et 4ml de sucrose 5% ont été ajoutés et centrifugés pendant 24 h à 39 000 rpm dans un rotor SW41 (Beckman). Suite à cette centrifugation à haute vitesse, un gradient de densité de sucrose est obtenu et douze fractions de 1ml sont été récoltées au ménisque de haut en bas et analysées. Les concentrations de cholestérols et de protéines de chaque fraction ont été évaluées à l'aide de kits commercialement disponibles utilisés selon les directives du manufacturier ; *Amplex red cholesterol assay kit* (Molecular Probes) et *BCA Protein assay kit* (Pierce Biotechnology). Les fractions 4 et 5 sont riches en cholestérol et contiennent les RL, tandis que les fractions 10 à 12 contiennent des protéines membranaires solubles.

7. Immunocytofluorescence

Les CE-BHE humaines (5×10^4 cellules/puits) ont été mises en cultures primaires dans des puits sur une lame en plastique traitée avec 0,5% de gélatine (Thermo Scientific) jusqu'à qu'elles soient confluentes dans du milieu de culture enrichi avec 40% de MCA. Les CE-BHE ont été activées en présence ou en absence TNF (100 U/ml) et d'IFN- γ (100 U/ml) pendant 16 h à 37°C. Ensuite, les cellules ont été lavées avec du PBS et fixées pendant 5 min avec 4% de paraformaldéhyde. L'attachement non-spécifique des anticorps a été bloqué pendant 30 min à TA avec 10% de sérum de chèvre (SC) et les cellules ont été incubées pendant 1 h à TA avec l'anticorps primaire murin anti-Ninjurin-1 (1:50; BD Biosciences). Après plusieurs lavages avec du PBS + 0,05% de Tween 20 (Sigma), l'anticorps secondaire chèvre anti-souris Alexa 488 (Invitrogen) a été ajouté et incubé pendant 40 min à TA. Suite aux lavages, les lamelles ont été placées sur les lames avec du Gelvatol (20% Glycérol, 10% Polyvinyl Alcohol, 0,1M Tris-HCl pH 8,0) contenant le colorant nucléaire TO-PRO-3 (1:300; Invitrogen). Les contrôles négatifs ont été effectués en omettant l'anticorps primaire des immunocolorations. Les images ont été acquises et analysées à l'aide du microscope confocal Leica TCS SP5 (Leica Microsystems).

L'adhérence homophile, médiée par Ninjurin-1, entre les monocytes humains CD14⁺ et les CE-BHE a été évaluée à l'aide de la microscopie confocale. Les CE-BHE ont été traitées avec du TNF (100 U/ml) et de l'IFN- γ (100 U/ml) pendant 8 h à 37°C. Les monocytes CD14⁺ ont été isolés tel que décrit ci-dessus et ont été resuspendus à une concentration de 5×10^6 cellules/ml dans du RPMI 1640 (Wisent Inc.) chauffé, pour être incubés pendant 10 min à 37°C avec 5mM du colorant *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE ; 1:1000; Invitrogen). La réaction de marquage du CFSE a été arrêtée avec du SH et après deux lavages avec du RPMI 1640, les monocytes CD14⁺ ont été resuspendus dans le milieu de culture des CE-BHE et ont été ajoutés à la monocouche de CE-BHE pendant 2 h à 37°C à un ratio de 1:1. L'immunoréactivité des cellules a été effectuée tel que décrit ci-dessus. Une reconstruction de l'axe Z (X-Z et Y-Z) par microscopie

confocale permet d'observer l'interaction homophile entre les monocytes et les CE-BHE.

8. Colorations histologiques et immunohistofluorescence du tissu du SNC humain et murin

Pour l'utilisation de cerveau humain obtenu de patients atteints de SEP ou de contrôles atteints de maladies non neurologiques, l'approbation éthique a été obtenue par le Comité scientifique et éthique du centre de recherche du CHUM (Numéro d'approbation : BH 07.001). Des sections montrant des lésions actives avec de la démyélinisation et une infiltration périvasculaire de cellules mononucléaires ont été sélectionnées (3 donneurs: 8 à 12 blocs par donneur) et ont été comparées à la matière blanche d'apparence normale (NAWM - *normal appearing white matter*) des mêmes patients ou avec des contrôles atteints de maladies non-neurologiques (3 donneurs; 4 à 6 blocs par donneur). L'âge moyen des patients est de 49 ± 6 ans et la durée de la SEP varie entre 3 et 23 ans. Les causes de mort des patients atteints de SEP sont la pneumonie (1), l'urosepsie (1) et l'intoxication au babilurate (1).

Tous les protocoles animaux ont été approuvés par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux du CHUM (N07027PAs). Le matériel du SNC des souris naïves ou atteintes d'EAE, traitées avec le peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ ou le peptide contrôle, a été récolté suite à une perfusion rapide intra-cardiaque au PBS et a été congelé dans l'azote liquide dans le composé O.C.T.TM (*Optimal Cutting Temperature* ; Sakura Finetek Inc).

Le tissu humain ou murin a été cryodécoupé (épaisseur de 7 μm), a été monté sur des lames Superfrost (Thermo Scientific) et a été fixé pendant 20 secondes dans l'acétone 100% à TA avant d'être entreposé à -80°C jusqu'à son utilisation pour les immunocolorations. Si nécessaire, la biotine endogène a été bloquée à l'aide du kit *Avidin/Biotin blocking kit* (Invitrogen), au début de l'immunohistocoloration, et selon les directives du manufacturier. L'attachement

non-spécifique des immunoglobulines a été bloqué pendant 30 minutes avec 10% de sérum d'âne (SA) à TA. Ensuite, les sections ont été incubées pendant 1 h à TA avec l'anticorps primaire mouton anti-Ninjurin-1 (1:100 pour le tissu humain et 1:30 pour le tissu murin) dilué dans 3% de SA. Suivant chaque incubation, les sections ont été lavées 7 fois, pendant 3 min à TA, avec du PBS + 0,05% de Tween 20. Les sections ont été incubées pendant 40 min avec l'anticorps secondaire âne anti-mouton conjugué avec l'Alexa 488 (1:400, Jackson Immunoresearch). Le deuxième lot d'anticorps primaires (tissu humain: souris anti-CD68 (1:100, Dako), souris anti-DC-SIGN (1:50, BD Biosciences), souris anti-CMH II (1:200, Dako) et lapin anti-Caveolin-1 (1:100, Santa Cruz Biotechnology) ; tissu murin: hamster anti-CD11c-biotinylé (1:30, BD Biosciences), rat anti-CMH II (1:30, BD Biosciences) et rat anti-F4/80 (1:80, BioLegend)) ont été incubés avec leur anticorps secondaires respectifs (âne anti-souris IgG-DyLight 549, âne anti-lapin IgG-Rhodamine Red X (RRX) ou âne anti-rat-DyLight 549 ; Jackson Immunoresearch). Les contrôles négatifs ont été effectués en omettant les anticorps primaires des immunocolorations. Les lamelles ont été placées sur les lames avec du Gelvatol contenant du TO-PRO-3 (1:300; Invitrogen) pour la coloration nucléaire. L'acquisition de la fluorescence a été réalisée grâce au microscope confocal Leica SP5 (Leica Microsystems). Le traitement et l'analyse des images a été fait avec le logiciel Adobe Photoshop CS2 (Adobe).

Le degré d'infiltration des cellules immunitaires et l'ampleur de la démyélinisation dans le tissu cérébral humain de patients atteints de SEP (autopsie) et dans le SNC (moelle épinière) de souris atteintes d'EAE ont été déterminés par la coloration *au Luxol Fast Blue* et à l'hématoxyline & l'éosine. Les sections ont été fixées dans 10% de formaldéhyde (Fisher Scientific) pendant 3 heures à TA et lavées au PBS 1X avant une incubation de 16 heures à 60°C avec le *Luxol Fast Blue* (1% Solvent Blue 38 (Sigma), 95% éthanol et 0,05% acide acétique glaciale (Fisher Scientific)). La différenciation des sections a été réalisée avec une solution aqueuse de 0,4% d'hydroquinone (Sigma) et de 5% de sulfite de sodium (Sigma). Les sections ont été immergées dans l'hématoxyline de Harris (Sigma) pendant 10 min, pour la coloration nucléaire, suivie d'une différenciation à l'acide-alcool (1% acide chlorhydrique dans une solution de 70% d'éthanol). Les

sections ont été bleutées dans une solution de 0,05% d'hydroxyde de sodium (VWR) et déshydratées dans un bain de 95% d'éthanol. La coloration du cytoplasme a été réalisée avec l'éosine Y (Sigma) pendant 1,5 min à TA suivit de bains d'éthanol 95% et 100% et d'une immersion finale dans le toluène. Les lamelles ont été placées sur les lames avec l'Entellan (Merck). Les images ont été prises avec le microscope à lumière directe Leica DM6000 (Leica Microsystems) et à l'aide du programme Improvision OpenLab 4.0.4 (PerkinElmer). Enfin, le traitement et l'analyse des images a été fait avec le logiciel Adobe Photoshop CS2 (Adobe).

9. Peptide bloquant Ninjurin-1

Les peptides humains et murins bloquants Ninjurin-1 correspondent aux séquences de 12 acides aminés (aa) du motif d'adhérence de Ninjurin-1 nécessaire pour l'adhérence homophile. Ces derniers sont localisés entre les aa 26 et 37 (séquence humaine: PARWGWRHGPIIN et séquence murine: PPRWGLRNRPIIN) et sont désignés Ninj₂₆₋₃₇. Un peptide contrôle, de 12 aa, a été synthétisé à partir de la séquence humaine de Ninj₂₆₋₃₇ et a été utilisé dans les études humaines et murines (séquence : WRGNPGIRWAPH). Les peptides ont été synthétisés chez Alpha Diagnostic International (ADI, San Antonio, Texas).

10. Le modèle *in vitro* de la BHE, transmigration de leucocytes et perméabilité des CE-BHE

Des CE-BHE mises en cultures primaires ont été utilisées pour générer le modèle *in vitro* de la BHE humaine à l'aide de la chambre de Boyden modifiée (**Schéma 4**). Les CE-BHE humaines (25×10^3 cellules/chambre du haut) ont été mises en culture sur des membranes poreuses de 3 μm (Becton Dickinson Labware) traitées avec 0,5% de gélatine dans du milieu de culture de CE

supplémenté avec 40% MCA et ce pendant 4 jours pour obtenir une monocouche de CE-BHE confluentes.

Pour les études de transmigration, les CE-BHE humaines ont été traitées en présence du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ humain (0,4 mM, ADI) ou traitées avec le peptide contrôle (0,4 mM, ADI) pendant 1 h à 37°C avant l'addition des leucocytes. Des monocytes CD14⁺ ou des lymphocytes T CD4⁺ ou des lymphocytes T CD8⁺ humains *ex vivo* ont été isolés, tel que décrits ci-dessus, et ajoutés à la chambre du haut (1 X 10⁶ cellules/chambre). La migration des monocytes CD14⁺ humains a aussi été effectuée en présence de l'anticorps mouton anti-Ninj₁ (10 µg/ml, R&D Systems) et son contrôle isotypique (Immunoglobuline G de mouton ; 10 µg/ml, R&D Systems). Les différents leucocytes ont transmigré à travers les CE-BHE pendant 24 h à 37°C et ceux qui ont complètement migré vers la chambre du bas ont été récoltés et comptés manuellement à l'aide d'un hémacytomètre. Les expériences ont été effectuées en triplicata.

Pour les études de perméabilité, les CE-BHE ont été mises en cultures en présence du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ humain (0,4 mM) ou traitées avec le peptide contrôle (0,4 mM) pendant 2 heures à 37°C. Ensuite, le traceur soluble, soit l'albumine de sérum bovin (BSA - *bovine serum albumin*) conjugué au fluorochrome *Fluorescein isothiocyanate* (FITC) a été ajouté dans la chambre du haut (BSA-FITC, 50 µg/ml, Invitrogen). Pour mesurer la diffusion du traceur, 50 µl de la chambre du haut et 50 µl de la chambre du bas ont été récoltés à 0, 2, 4, 6, 24, 48 et 72 h après l'addition du traceur soluble et mis dans des plaques à 96 puits à fonds plats. L'acquisition de la fluorescence des plaques a été déterminée grâce au lecteur SpectraMax Gemini (Molecular Devices). Le pourcentage de diffusion de la BSA-FITC a été déterminé par l'équation suivante :

$$(BSA-FITC \text{ chambre du haut} / BSA-FITC \text{ chambre du bas}) \times 100.$$

11. Prolifération des lymphocytes T

Le rôle de Ninjurin-1 dans la présentation antigénique et dans l'activation non-spécifique des lymphocytes T ont été évalué en utilisant le colorant CFSE. Les PBMC ont été isolés à partir du sang périphérique de donneurs sains et consentants, tel que décrit ci-dessus. Les cellules ont été resuspendues à une concentration de 10×10^6 cellules/ml dans du milieu RPMI 1640 chauffé et ont été incubées pendant 10 min à 37°C avec 5 mM de CFSE (1:1000; Invitrogen). La réaction de marquage au CFSE a été arrêtée avec du SH et suite à deux lavages avec du RPMI 1640, les PBMC ont été resuspendus dans du RPMI 1640 enrichi avec 5% de SH, 1% de pénicilline/streptomycine et 1% de glutamine et elles ont été activées avec l'anticorps soluble anti-humain CD3 (2,5 µg/ml, clone OKT3, eBioscience) et la protéine recombinante humaine IL-2 (20 U/ml, BD Biosciences). Les cellules ont été mises en culture en présence du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ ou du peptide contrôle (0,4 mM, ADI) pendant 6 jours à 37°C. Les cellules ont ensuite été récoltées pour l'analyse de l'expression des marqueurs CD3 et CD25 et de la dilution du CFSE par cytométrie de flux. L'acquisition des cellules a été faite à l'aide du cytomètre de flux BD LSR II à l'aide du logiciel BD FACSDiva (BD Biosciences).

12. Induction de l'EAE, scores cliniques et traitement du tissu

L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) a été induite par immunisation active chez des souris C57BL/6 provenant des Laboratoires Charles River (Montréal, Québec) et *Jackson Laboratories* (Bar Harbor, Maine). Tous les protocoles animaux ont été approuvés par le Comité Institutionnel de Protection des Animaux du CHUM (N07027PAs). Des souris femelles âgées de 7 à 8 semaines ont été injectées de façon sous-cutanée avec 200 µg du peptide *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG)₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK) émulsifié dans l'adjuvant complet de Freund (CFA - *Complete Freund's Adjuvant*) supplémenté avec 600 µg de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (DIFCO

Laboratories). Aux jours 0 et 2, les souris ont été injectées intra-péritonéalement avec 500 ng de la toxine pertussis (List Biological Laboratories). À partir du jour 3 et jusqu'au jour 23, les souris ont été injectées intra-péritonéalement, deux fois par jour, avec 200 µg du peptide murin bloquant Ninj₂₆₋₃₇ ($n = 8$, 2 expériences indépendantes). Le peptide contrôle a été administré de la même façon au groupe contrôle ($n = 8$). Les animaux ont été surveillés à chaque jour pour des signes cliniques d'EAE et le système des scores cliniques est comme suit : 0- aucun signe clinique ; 0,5- queue flaccide partielle ; 1- queue flaccide ; 2- ataxie ; 2,5- faiblesse des membres inférieurs ; 3- paralysie d'un membre inférieur ; 4- paralysie des deux membres inférieurs ; 4,5- faiblesse des membres antérieurs et 5- état moribond. Suite à une perfusion intra-cardiaque au PBS, la moelle épinière a été récoltée. Cette dernière a soit été gardée sur glace dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10% SBF, 1 % pénicilline/streptomycine et 1% de glutamine et a été homogénéisée à l'aide d'un tamis cellulaire de 70 µm pour obtenir une suspension cellulaire qui a été lysée, tel que décrit ci-dessus, pour l'analyse par immunobuvardage. Pour les études d'immunohistofluorescence, le tissu du SNC a directement été placé dans l'O.C.T.TM (Sakura Finetek Inc) et a été congelé dans l'azote liquide et entreposé à -80°C. Les études semi-quantitatives des cellules présentatrices d'antigène (CPA) myéloïdes, soit les CPA CMH II⁺, les macrophages F4/80⁺ et les DC CD11c⁺, ont été réalisées dans les sections de moelles épinières de souris atteintes d'EAE traitées avec le peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ ou le peptide contrôle (200 µg, ADI). Ces cellules ont été comptées à l'aide du programme Image J (NIH Image) dans > 20 champs différents de 60X pour chaque type cellulaire, de chaque souris traitées avec le peptide bloquant ou le peptide contrôle.

13. Analyses statistiques

Les analyses statistiques ont été réalisées avec le logiciel GraphPad PRISM 4.0 (GraphPad software) et les données représentent les chiffres absolus ou les moyennes \pm l'erreur type de la moyenne (SEM - *standard error of the mean*). La méthode d'analyse du test t de Student (non-pairé) a été utilisée pour comparer les données des expériences à l'aide du peptide Ninj₂₆₋₃₇ ou de l'anticorps anti-Ninjurin-1 avec les contrôles respectifs. Seulement les Valeurs *P* (*P values*) $< 0,05$ ont été considérées comme étant significatives. Les données montrées sont soit représentatives de trois expériences ou plus, ou elles représentent des combinaisons de trois à dix expériences.

RÉSULTATS

Suite à une analyse par protéomique des protéines associées à la barrière hémato-encéphalique (BHE) humaine, plusieurs types de protéines ont été identifiées dans les cultures primaires de cellules endothéliales de la BHE (CE-BHE) (Cayrol et al., 2008). Plus spécifiquement, de nombreuses molécules d'adhérence potentiellement impliquées dans la transmigration des leucocytes à travers la BHE, dont la protéine *Nerve injury-induced protein* (Ninjurin)-1, ont été retrouvées dans les CE-BHE. Ninjurin-1 est une molécule d'adhérence qui a initialement été identifiée à partir de neurones et de cellules de Schwann (Araki and Milbrandt, 1996). L'expression de Ninjurin-1 n'avait pas précédemment été rapportée dans les CE-BHE humaine. Nous avons donc entrepris l'étude du rôle de la protéine Ninjurin-1 dans le développement de l'inflammation cérébrale.

1. L'expression de Ninjurin-1 augmente dans les cultures primaires de CE-BHE dans un contexte inflammatoire

En premier lieu, des techniques de cytométrie de flux, de microscopie confocale et d'immunobuvardage ont été utilisées pour confirmer l'expression de Ninjurin-1 dans les cultures primaires de CE-BHE (**Figures 1 à 4**). L'analyse par cytométrie de flux démontre que Ninjurin-1 est exprimée à la surface de 72,7% des CE-BHE dans des conditions basales (**Figure 1**, panneau de gauche). Lorsque les CE-BHE ont été mises en culture en présence de milieu conditionné par les astrocytes (MCA), pour mimer le microenvironnement cérébral, une légère diminution de l'expression de Ninjurin-1 (63,0%, **Figure 1**, panneau central) est observée. La sclérose en plaques (SEP) est caractérisée par des lésions inflammatoires périvasculaires contenant différentes cytokines pro-inflammatoires, dont le TNF et l'IFN- γ , qui sont sécrétées par différents leucocytes infiltrants ou par les cellules résidentes du SNC (Korn, 2008). Lorsque les CE-BHE ont été activées en présence de ces cytokines, l'expression basale de Ninjurin-1 est augmentée et ce suite à un traitement de 24h (**Figure 1**). En effet, la proportion de cellules qui expriment cette molécule d'adhérence passe de 72,7% à 98,3% en présence de TNF/IFN- γ (**Figure 1**, panneau de droite). De plus, la moyenne de l'intensité de

fluorescence (MFI – *mean fluorescence intensity*) de Ninjurin-1 est plus élevée sur les CE-BHE activées et cela indique qu'il y a une augmentation du nombre de molécules de Ninjurin-1 à la surface de ces CE-BHE (MFI : 1452, **Figure 1**, panneau de droite). Les analyses d'immunocytofluorescence ont révélé que l'expression de Ninjurin-1 (vert) augmente également à la surface des CE-BHE dans les mêmes conditions expérimentales en présence des cytokines pro-inflammatoires TNF/IFN- γ (**Figure 2**). Enfin, les expériences par immunobuvardage ont démontré une augmentation importante de l'expression de Ninjurin-1 par le CE-BHE dans des conditions inflammatoires et ce comparé aux CE-BHE non-activées (**Figure 3**). Il est important de noter que l'anticorps utilisé anti-Ninjurin-1 est spécifique à cette molécule d'adhérence car les immunobuvardages de Ninjurin-1 contiennent une seule bande correspondant à la taille de la protéine, soit entre 17 et 22 kDA. Ces données concordent avec le fait que l'expression des molécules d'adhérence augmente dans les CE-BHE pour faciliter le recrutement de différents leucocytes au site d'inflammation, soit au sein du SNC dans un contexte inflammatoire (Wong et al., 2007; Wong and Dorovini-Zis, 1992; Wong and Dorovini-Zis, 1995). Lors de la transmigration leucocytaire, les molécules d'adhérence se regroupent au niveau des radeaux lipidiques (RL), riches en cholestérol et sphingolipides, pour faciliter l'activation des kinases intracellulaire et faciliter le recrutement des cellules immunitaires à travers l'endothélium (Dodelet-Devillers et al., 2009). Dans ce contexte, l'expression de Ninjurin-1 dans les RL riches en cholestérol (Fraction 4, **Figure 4**, panneau du haut) dans des conditions basales et inflammatoires a été documentée. Alors que Ninjurin-1 est pratiquement absente dans les RL dans des conditions basales, son expression dans les RL augmente légèrement suite à une stimulation en présence des cytokines TNF/IFN- γ (**Figure 4**, panneau du bas). Ceci confirme la redistribution de cette molécule d'adhérence dans des microstructures de la membrane cytoplasmique endothéliale lors de l'inflammation qui a été induite par les cytokines TNF et IFN- γ . Toutes ces observations suggèrent qu'un milieu inflammatoire induit l'augmentation de l'expression de Ninjurin-1 ainsi que sa relocalisation dans les RL des CE-BHE, soit deux arguments supportant le rôle possible de Ninjurin-1 comme molécule d'adhérence leucocytaire.

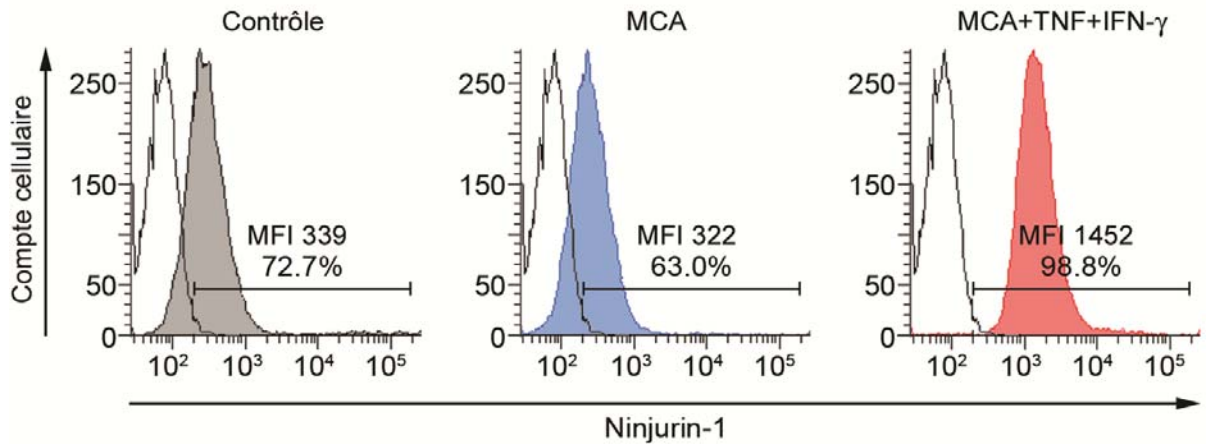


Figure 1 : L'expression de Ninjurin-1 est augmentée sur les CE-BHE humaines dans un contexte inflammatoire par cytométrie de flux

Analyse par cytométrie de flux de l'expression de Ninjurin-1 dans des cultures primaires de CE-BHE (panneau de gauche), traitées ou non avec du milieu conditionné par les astrocytes (MCA) (40%, 24 h) (panneau central) ou activées avec les cytokines pro-inflammatoires TNF et IFN- γ (100 U/ml, 24 h) et ce en présence de MCA (panneau de droit). Le contrôle isotypique est représenté par les histogrammes clairs et l'expression de Ninjurin-1 est représentée par les histogrammes gris. La moyenne de l'intensité de fluorescence (MFI – *mean fluorescence intensity*) de Ninjurin-1 et le pourcentage de cellules Ninjurin-1⁺ sont indiqués sur les histogrammes. Les données montrées sont représentatives de dix expériences indépendantes utilisant un nombre équivalent de préparations de CE-BHE humaines.

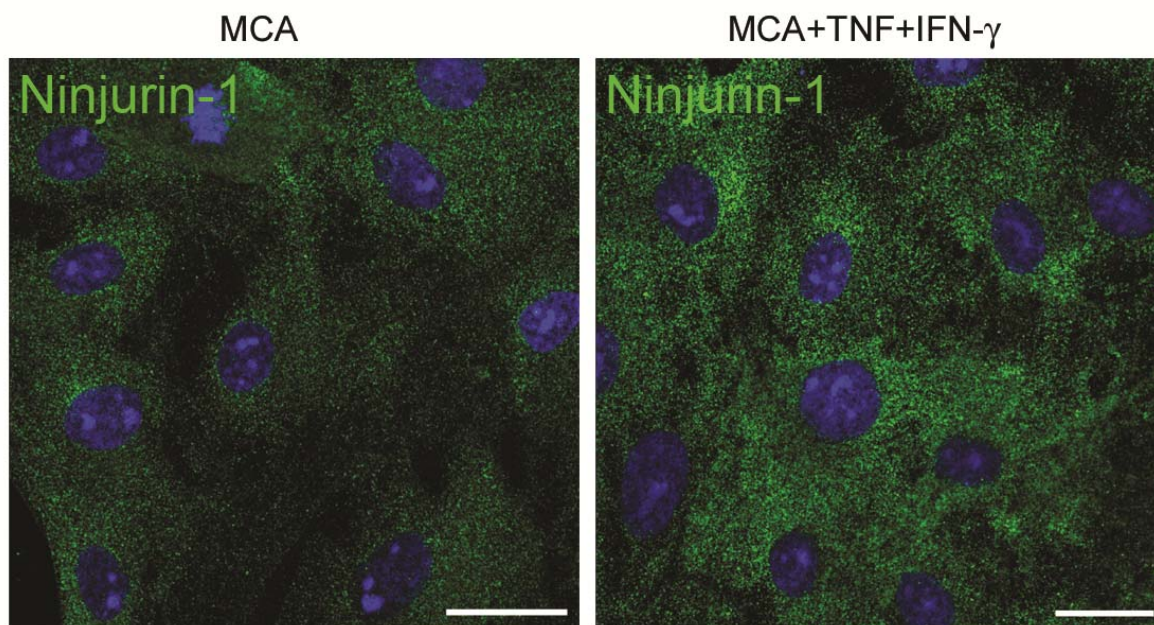


Figure 2 : L'expression de Ninjurin-1 est augmentée dans les cultures primaires de CE-BHE dans un contexte inflammatoire par immunocytofluorescence

Analyse par immunocytofluorescence de Ninjurin-1 dans des cultures primaires de CE-BHE non-activées et activées. La microscopie confocale confirme l'expression de Ninjurin-1 (vert) à la surface des CE-BHE et l'augmentation de son expression suite à un traitement en présence des cytokines pro-inflammatoires TNF et IFN- γ (100 U/ml, 16 h) et en présence de MCA (40%). Le TO-PRO-3 a été utilisé pour la coloration du noyau (bleu). Les données montrées sont représentatives de trois expériences indépendantes utilisant un nombre équivalent de préparations de CE-BHE humaines. Barres d'échelle: 10 μ m.

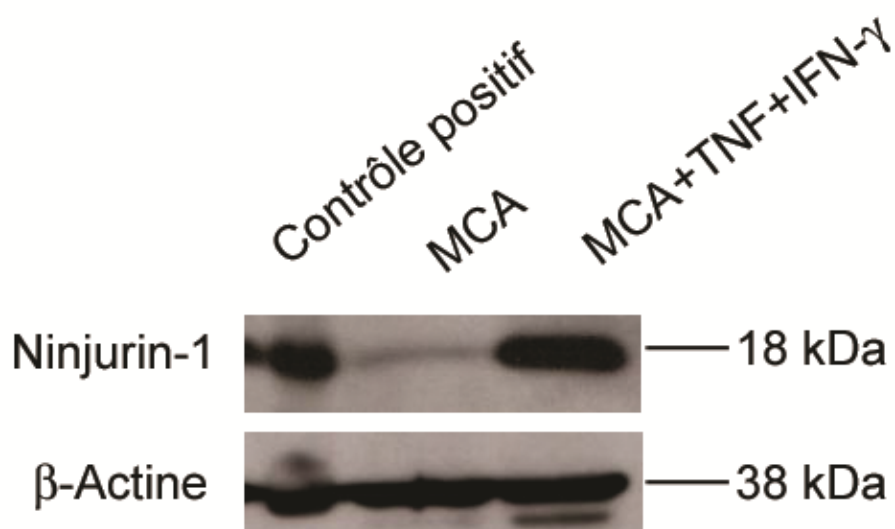


Figure 3 : L'expression de Ninjurin-1 est augmentée dans les CE-BHE humaines dans un contexte inflammatoire par immunobuvardage

Immunobuvardage de l'expression de Ninjurin-1 dans les CE-BHE humaines à l'état basal et suite à un traitement avec les cytokines TNF et IFN- γ (100 U/ml, 16 h) en présence de MCA (40%). L'augmentation de l'expression de Ninjurin-1 est confirmée dans un contexte inflammatoire. La β -actine a été utilisée comme contrôle interne de chargement. Le lysat cellulaire de cellules HepG2 a été utilisé en tant que contrôle positif pour l'expression de Ninjurin-1. Les données montrées sont représentatives de trois expériences indépendantes utilisant un nombre équivalent de préparations de CE-BHE humaines.

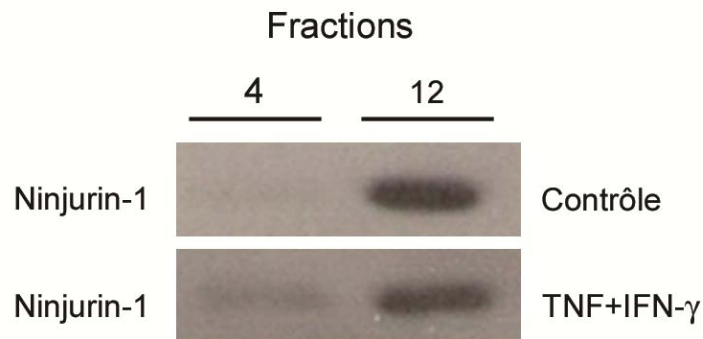
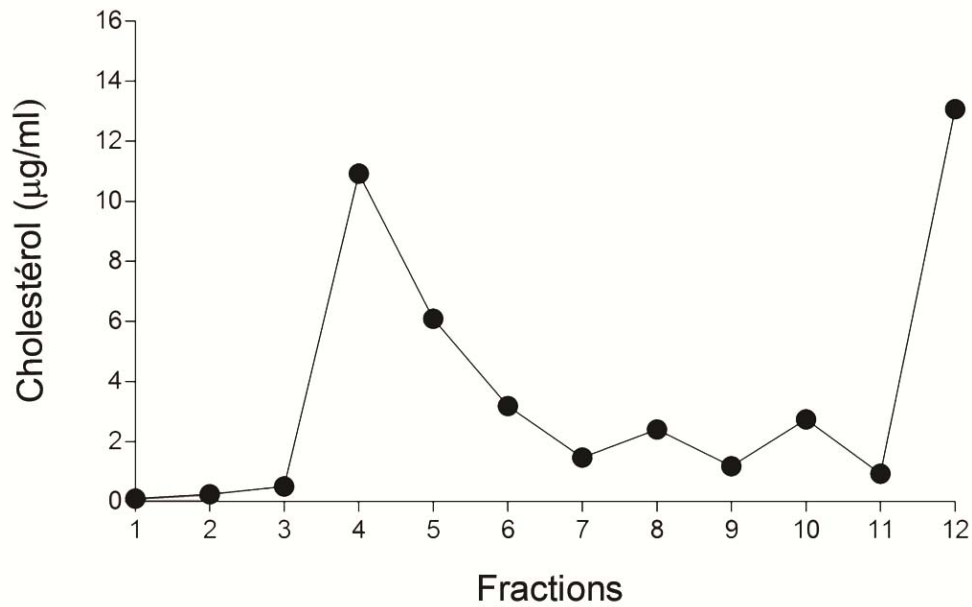


Figure 4 : Ninjurin-1 s'accumule dans les radeaux lipidiques dans les cultures primaires de CE-BHE humaines dans un contexte inflammatoire

Concentrations de cholestérol des différentes fractions obtenues suite à l'isolation des radeaux lipidiques (RL) des cultures primaires de CE-BHE humaines (panneau du haut). Les RL se retrouvent dans la fraction 4, riche en cholestérol. Immunobuvardage des fractions contenant les RL (fraction 4) et les protéines solubles (fraction 12). Il y a une accumulation de Ninjurin-1 dans les RL des CE-BHE activées en présence des cytokines pro-inflammatoires TNF et IFN- γ (100 U/ml, 24 h). Les données montrées sont représentatives de deux expériences indépendantes utilisant un nombre équivalent de préparations de CE-BHE humaines.

2. Ninjurin-1 est préférentiellement exprimée sur les cellules présentatrices d'antigène myéloïdes

Pour permettre aux cellules immunitaires de passer à travers la BHE, les molécules d'adhérence exprimées à la surface de l'endothélium vasculaire doivent se lier avec leurs contres-ligands exprimés par les leucocytes. Puisque Ninjurin-1 médie une adhérence de type homophile (Ninjurin-1-Ninjurin-1) et qu'elle est exprimée sur les CE-BHE, ceci suggère qu'elle pourrait jouer un rôle dans la transmigration des leucocytes. Ainsi, l'expression de Ninjurin-1 sur différents leucocytes du sang périphérique humain a été documentée. L'analyse par cytométrie de flux des leucocytes *ex vivo*, isolés à partir de cellules mononucléaires du sang périphérique (PBMC - *Peripheral blood mononuclear cells*) de donneurs sains a démontré que Ninjurin-1 est exprimée à de très faibles niveaux sur les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ et sur les lymphocytes B CD19⁺, soit à 5,7%, 6,1% et 8,1% respectivement (**Figure 5**). Par contre, Ninjurin-1 est exprimée à la surface cellulaire de la moitié de la population des monocytes CD14⁺ (46,7%, **Figure 5**). L'expression préférentielle de Ninjurin-1 par les monocytes *ex vivo* est confirmée par immunobuvardage (**Figure 6**). Ensuite, l'expression de Ninjurin-1 à la surface de différentes cellules présentatrices d'antigène (CPA) de la lignée myéloïde, soit les macrophages et les cellules dendritiques (DC) dérivés des monocytes du sang périphérique a été analysée par cytométrie de flux. Les DC et les macrophages ont été générés *in vitro* à partir de PBMC adhérents, soit les monocytes (Seguin et al., 2003a). Les macrophages ont été récoltés après 8 jours de culture, lorsqu'ils ont acquis les marqueurs d'activation et la morphologie de macrophages associés à leur différenciation. Les DC matures ont été récoltées après 8 jours de culture en présence de GM-CSF, de l'IL-4 humaine recombinante et de LPS. L'expression de Ninjurin-1 est significativement augmentée sur les macrophages CD68⁺ (77,1%) et les DC myéloïdes matures CD83⁺ (98,2%) qui ont été générés *in vitro* à partir de monocytes CD14⁺ *ex vivo* (**Figure 7**). Ces données indiquent que Ninjurin-1 pourrait être impliquée dans la fonction migratoire des CPA myéloïdes pour traverser la BHE.

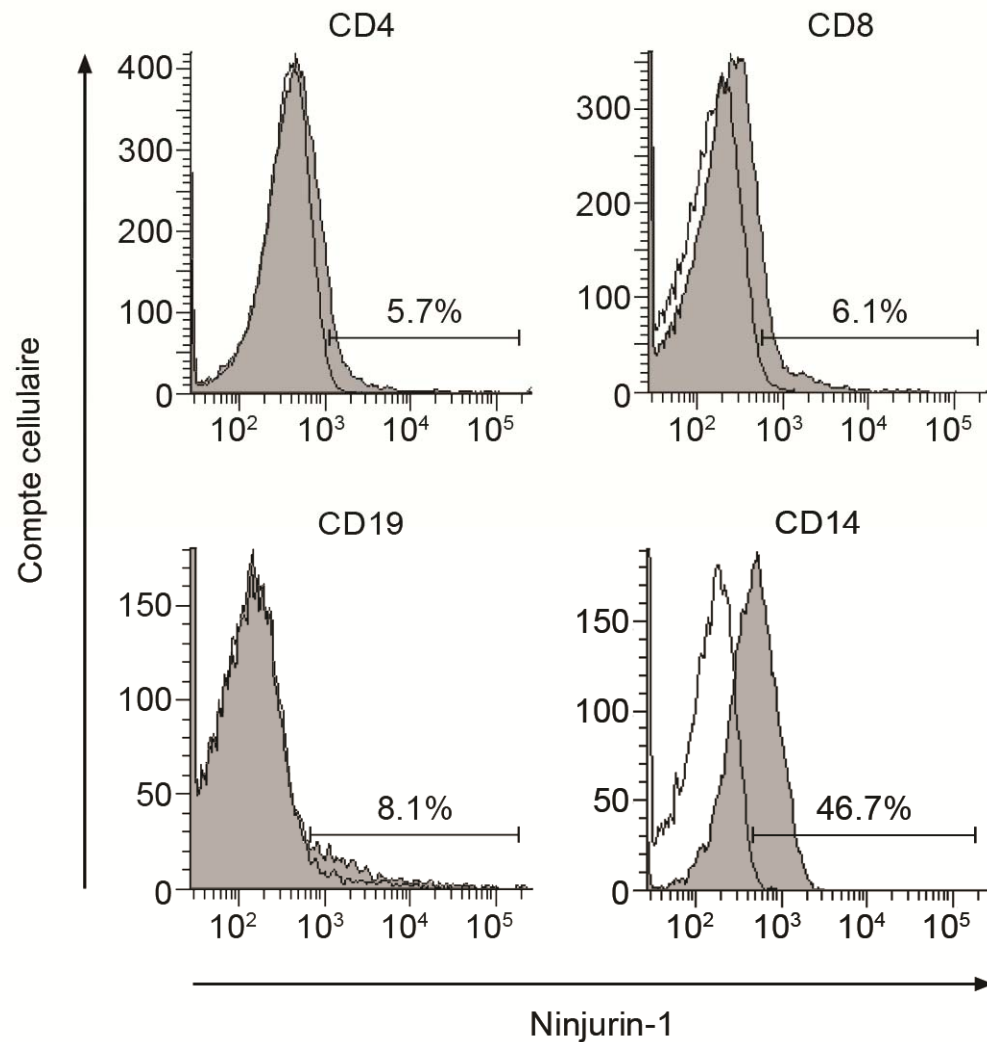


Figure 5 : Ninjurin-1 est préférentiellement exprimée sur les monocytes humains *ex vivo* par cytométrie de flux

Analyse par cytométrie de flux de l'expression de Ninjurin-1 sur les lymphocytes humains *ex vivo* (CD4⁺, CD8⁺ et CD19⁺) et les monocytes humains *ex vivo* CD14⁺. L'analyse démontre une faible expression de Ninjurin-1 sur les lymphocytes T et B et une expression préférentielle sur les monocytes CD14⁺. Les contrôles isotypiques et l'expression de Ninjurin sont représentés respectivement par les histogrammes clairs et gris. Le pourcentage de cellules Ninjurin-1⁺ sont indiqués sur les histogrammes. Les données montrées sont représentatives de sept expériences indépendantes avec un nombre équivalent de donneurs sains.

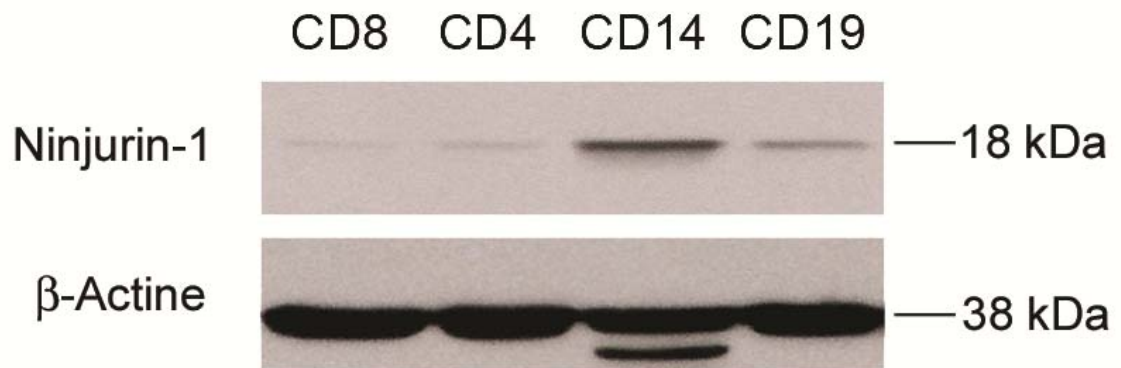


Figure 6 : Ninjurin-1 est préférentiellement exprimée par les monocytes par immunobuvardage

L'analyse par immunobuvardage confirme le profil d'expression de Ninjurin-1 dans les leucocytes humains *ex vivo* (CD8⁺, CD4⁺, CD14⁺ et CD19⁺). Ninjurin-1 est préférentiellement exprimée par les monocytes et ce comparé aux lymphocytes humains. La β -actine a été utilisée comme contrôle interne de chargement. Les données montrées sont représentatives de cinq expériences indépendantes avec un nombre équivalent de donneurs sains.

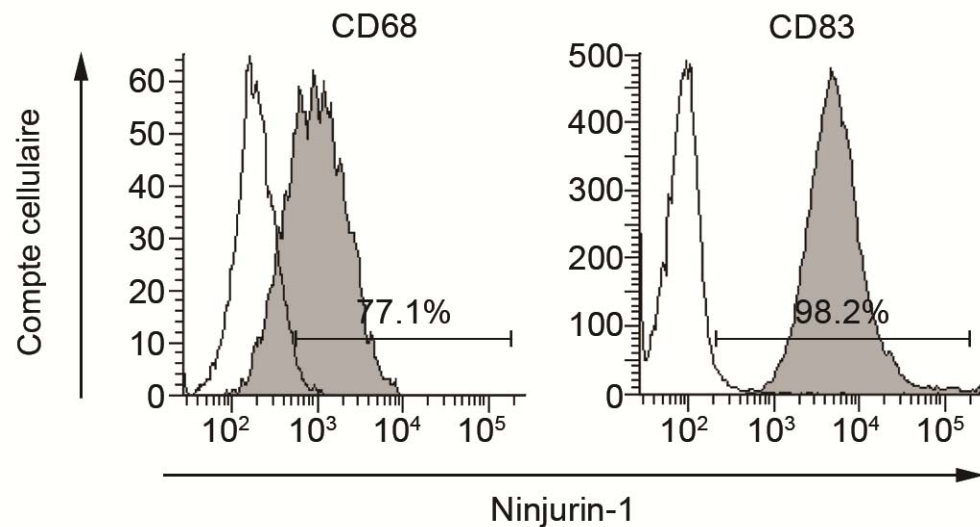


Figure 7 : Ninjurin-1 est exprimée à de hauts niveaux sur les CPA myéloïdes humaines

L'analyse par cytométrie de flux de l'expression de Ninjurin-1 sur les macrophages CD68⁺ et les cellules dendritiques CD83⁺ générés *in vitro*, à partir de monocytes humains CD14⁺, démontre une expression élevée de Ninjurin-1 sur les CPA myéloïdes. Les contrôles isotypiques et l'expression de Ninjurin sont représentés respectivement par les histogrammes clairs et gris. Le pourcentage de cellules Ninjurin-1⁺ sont indiqués sur les histogrammes. Les données montrées sont représentatives de deux expériences indépendantes avec un nombre équivalent de donneurs sains.

3. L'expression de *Ninjurin-1* augmente dans le SNC des souris atteintes d'EAE

Pour étudier l'expression de *Ninjurin-1* dans le contexte de maladies inflammatoires du SNC, le modèle murin de la SEP a été utilisé. L'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE) a été induite par immunisation active avec le peptide *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG)₃₅₋₅₅, émulsifié dans l'adjuvant complet de Freund (CFA – *complete Freund's adjuvant*), chez les souris de la souche C57BL/6. La caractérisation de l'expression et de la distribution de *Ninjurin-1* dans le SNC des souris atteintes d'EAE a été effectuée. Araki *et al.* avaient observé que *Ninjurin-1* est faiblement exprimée dans le SNC des rongeurs (Araki *et al.*, 1997). Nos résultats ont confirmé les observations d'Araki *et al.*, car *Ninjurin-1* est faiblement exprimée dans la moelle épinière des souris naïves C57BL/6 (contrôle, **Figure 8**). Une fois la maladie établie, au jour 13, des immunobuvardages ont été effectués à partir de protéines isolées du SNC (moelle épinière) et ont démontré une augmentation de *Ninjurin-1* dans le SNC chez les souris atteintes d'EAE ayant des scores cliniques de 1 et de 3, et ce comparé aux souris contrôles non-immunisées (**Figure 8**). Il est intéressant de noter qu'il y a une corrélation entre les scores cliniques des souris atteintes d'EAE et l'expression de *Ninjurin-1* dans le SNC. Pour déterminer quels types cellulaires expriment *Ninjurin-1* dans les infiltrats leucocytaires au sein du SNC des souris atteintes d'EAE, des analyses histopathologiques de l'expression de *Ninjurin-1* dans les moelles épinières congelées ont été effectuées par microscopie confocale. Ces analyses ont permis d'observer que *Ninjurin-1* est exprimées par la plupart des CPA myéloïdes infiltrant le SNC ainsi que la majorité des CE cérébrales (**Figure 9**). En effet, l'expression de *Ninjurin-1* est co-localisée avec les marquages CMH II⁺ (CPA), CD11c⁺ (DC) et F4/80⁺ (macrophages) dans la moelle épinière des souris atteintes d'EAE avec un score clinique de 4, soit au pic de la maladie (jour 14 post-immunisation; **Figure 9**). Ces données sont en accord avec les données *ex vivo* et *in vitro* humaine où *Ninjurin-1* est préférentiellement exprimée par les CPA myéloïdes, tout du moins au niveau du sang périphérique (de donneurs sains).

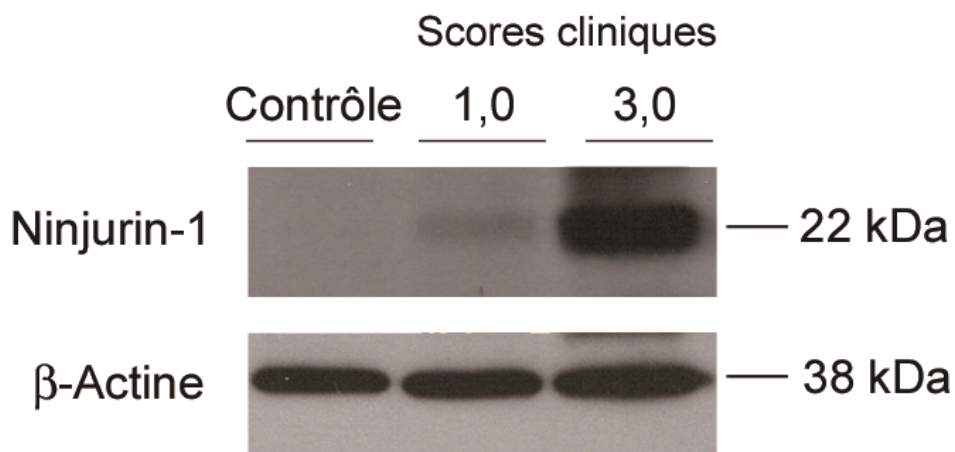


Figure 8 : L'expression de Ninjurin-1 augmente dans le SNC des souris atteintes d'EAE au pic de la maladie par immunobuvardage

Analyse par immunobuvardage de l'expression de Ninjurin-1 dans la moelle épinière de souris de la souche C57BL/6 naïves (contrôle) et des souris atteintes d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) induite avec le peptide *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG)₃₅₋₅₅ et l'adjuvant complet de Freund (CFA) au pic de la maladie (jour 13 post-immunisation, scores cliniques de 1,0 et 3,0). La β-actine a été utilisée comme contrôle interne de chargement. Les données montrées sont représentatives de deux expériences indépendantes.

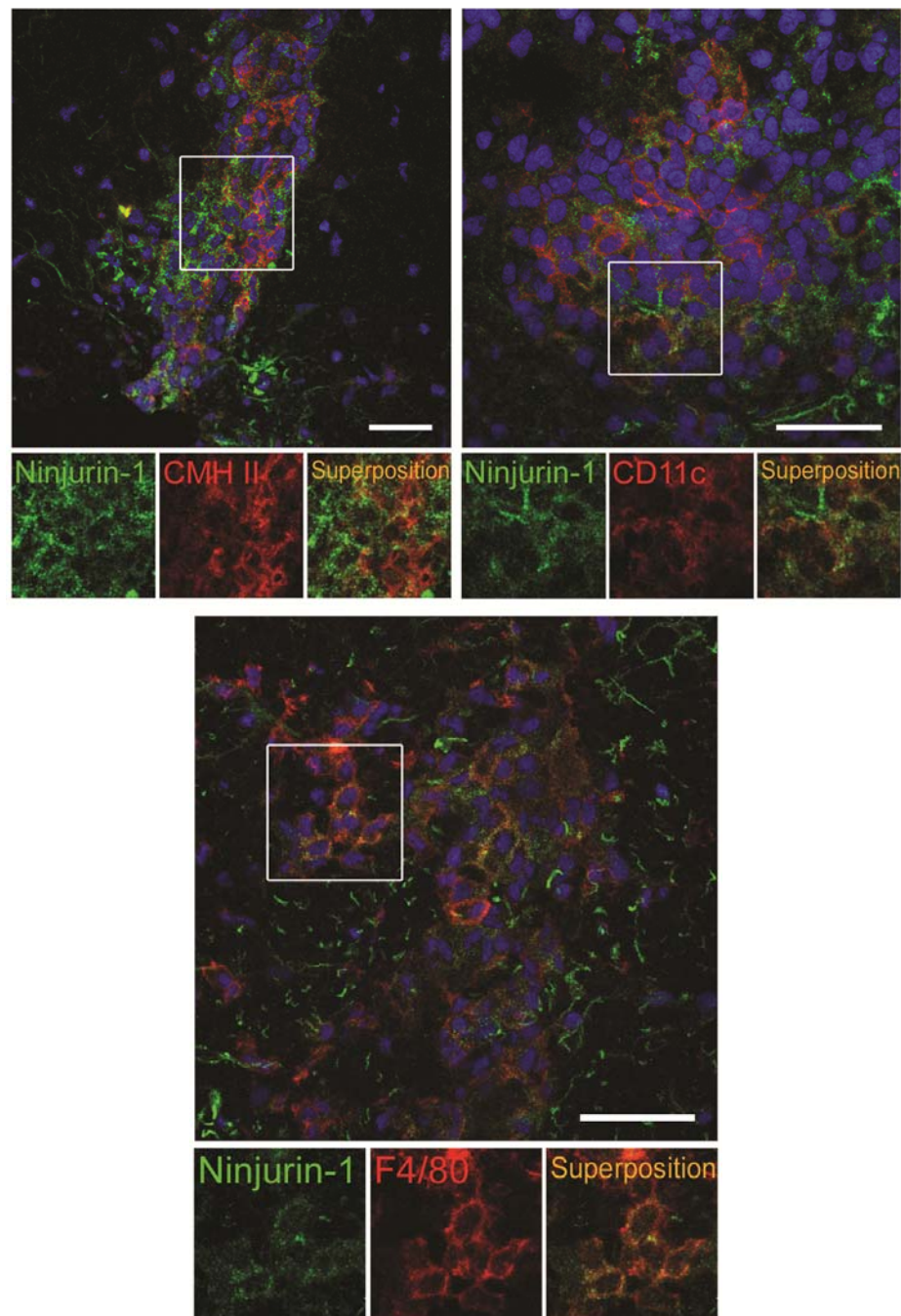


Figure 9 : L'expression de Ninjurin-1 augmente dans le SNC des souris atteintes d'EAE au pic de la maladie par immunohistofluorescence

Les moelles épinières congelées des souris de la souche C57BL/6 atteintes d'EAE suite à l'immunisation active avec le peptide MOG₃₅₋₅₅/CFA au pic de la maladie (jour 14 post-immunisation, score clinique de 4,0), ont été immunocolorées pour Ninjurin-1 (vert), les CPA CMH II⁺ (rouge, panneaux de gauche du haut), les DC CD11c⁺ (rouge, panneaux droite du haut) et les macrophages F4/80⁺ (rouge, panneaux du bas). Le TO-PRO-3 a été utilisé pour la coloration des noyaux (bleu). Les régions avec un fort grossissement confirment la co-localisation de Ninjurin-1 (vert) dans les CPA myéloïdes (rouge). Les données montrées sont représentatives de >20 champs obtenus de deux expériences indépendantes effectuées sur deux souris. Barres d'échelle: 30 µm.

4. L'expression de Ninjurin-1 augmente dans les lésions actives au sein du SNC des patients atteints de SEP

Comme pour l'EAE, la SEP est caractérisée par l'infiltration périvasculaire de cellules immunitaires au sein du SNC. Par conséquent, l'expression de Ninjurin-1 dans le contexte de cette pathologie a été évaluée dans du tissu cérébral congelé *post-mortem* de patients atteints de SEP pour confirmer nos observations *ex vivo et in vitro*. Les analyses histopathologiques de l'endothélium vasculaire de la matière blanche d'apparence normale ont confirmé l'expression et la co-localisation de Ninjurin-1 dans les CE-BHE qui expriment le marqueur Caveolin-1 (panneaux du haut, **Figure 10**). Par contre, l'expression de Ninjurin-1 est faible dans l'endothélium vasculaire cérébral humain de la matière blanche d'apparence normale. Les lésions actives au sein du SNC des patients atteints de SEP contiennent des leucocytes qui participent au développement de cette maladie inflammatoire chronique. Dans le tissu cérébral des patients atteints de SEP, l'expression de Ninjurin-1 est augmentée dans les lésions actives caractérisées par des infiltrations de leucocytes périvasculaires et de démyélinisation active. En effet, Ninjurin-1 est fortement exprimée par les CE-BHE Caveolin-1⁺ (panneaux du bas, **Figure 10**) et par quelques cellules infiltrantes (flèches, panneaux du bas, **Figure 10**). En effet, les CPA myéloïdes, soit les CPA CMH II⁺, les macrophages CD68⁺ et les DC *dendritic cell-specific ICAM-3 grabbing non-integrin* (DC-SIGN)/CD209⁺ infiltrants le SNC, de patients atteints de SEP, expriment la molécule d'adhérence Ninjurin-1 (**Figure 11**). Ces analyses permettent de confirmer que Ninjurin-1 est exprimée par les CPA myéloïdes humaines générées *in vitro* (**Figure 7**) et sur les CPA *in situ* ayant infiltré le SNC des patients atteints de SEP.

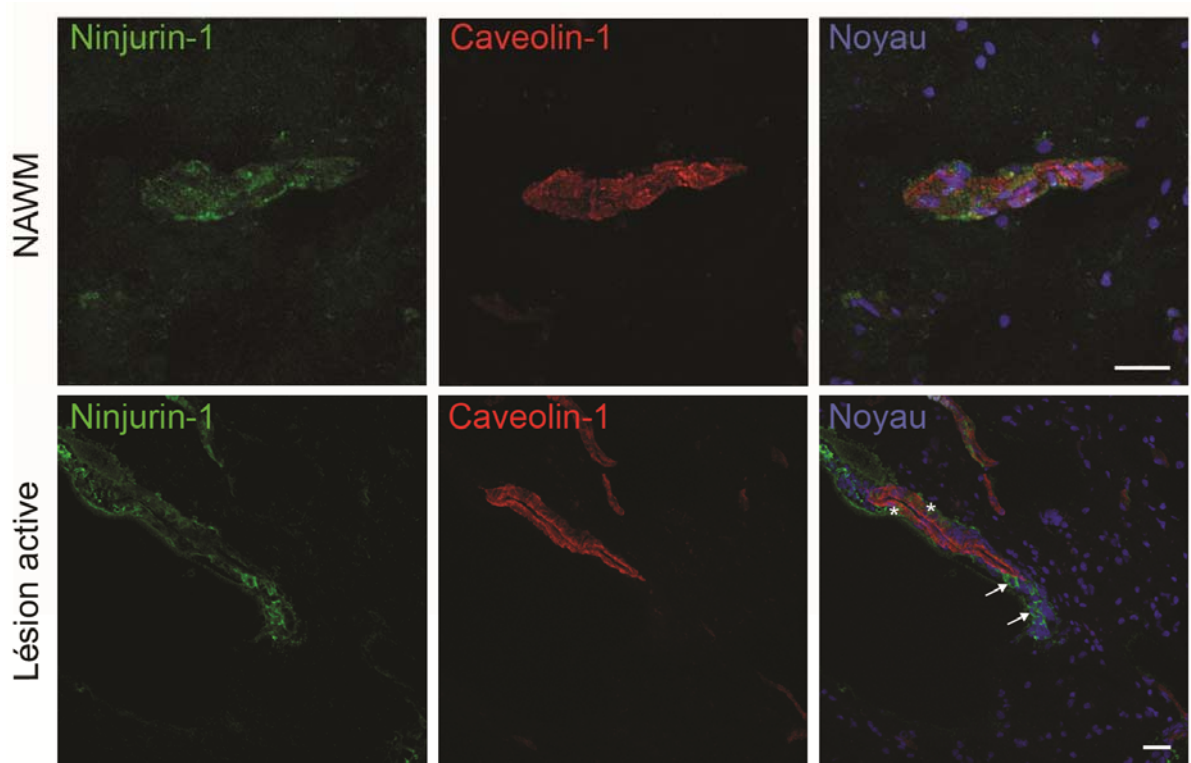


Figure 10 : L'expression de Ninjurin-1 augmente dans l'endothélium vasculaire dans des lésions actives au sein du SNC des patients atteints de SEP

Immunohistofluorescence de Ninjurin-1 dans la matière blanche d'apparence normale (NAWM - *normal appearing white matter*, panneaux du haut) et dans une lésion active (panneaux du bas) du matériel post-mortem congelé du SNC d'un patient atteint de SEP. Co-expression de Ninjurin-1 (vert) et des CE Caveolin-1⁺ (rouge) dans la matière blanche d'apparence normale et dans les CE des lésions actives de patients atteints de SEP (astérisques). Des cellules ayant infiltré le SNC expriment également Ninjurin-1 (flèches). Les images montrées sont représentatives de >20 champs obtenus d'immunohistocolorations effectuées sur 12 lésions actives et 15 matières blanches d'apparence normale obtenues à partir de matériel du SNC de trois patients atteints de SEP. Barres d'échelle: 30 μ m.

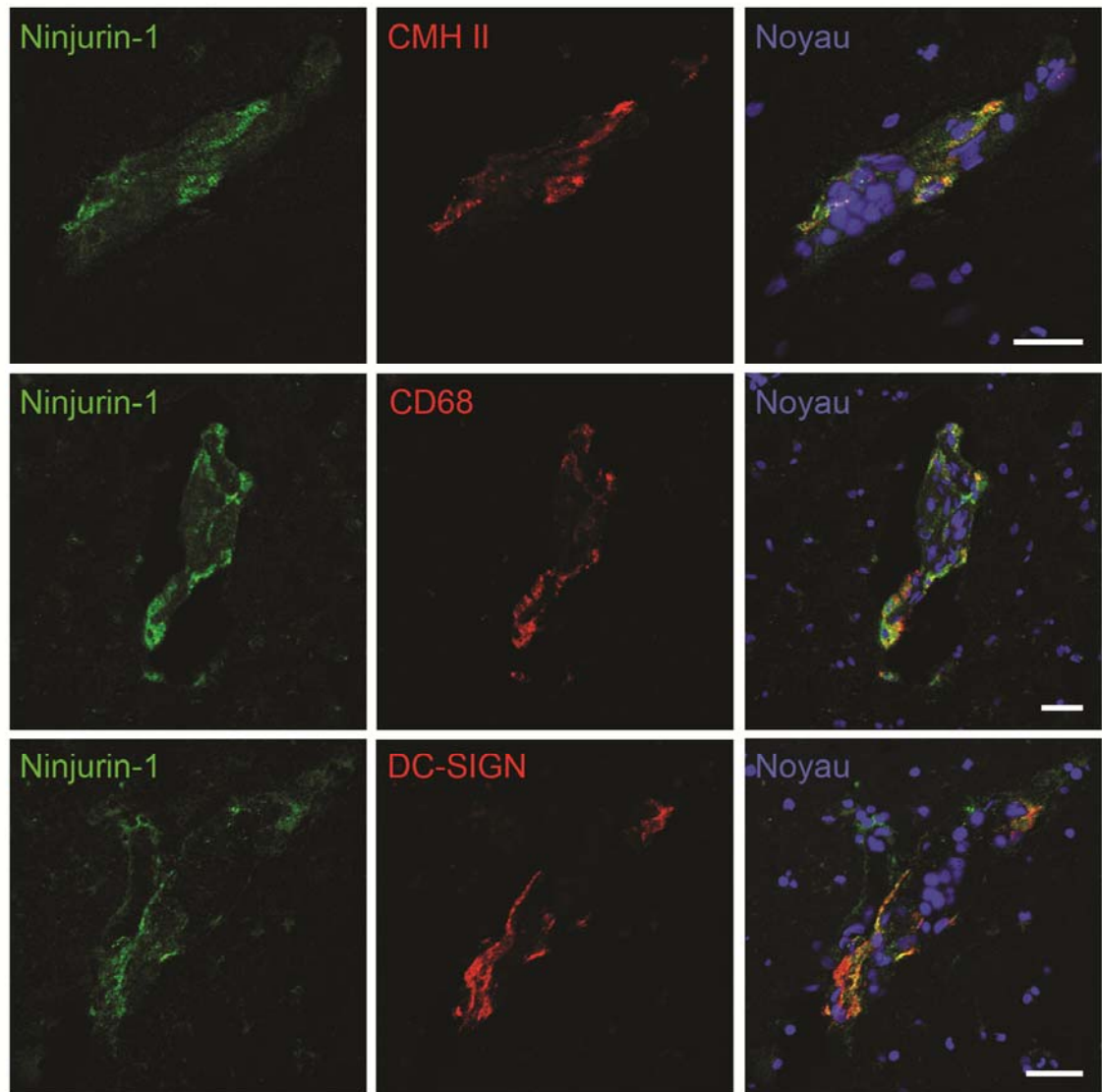


Figure 11 : L'expression de Ninjurin-1 est élevée dans les CPA myéloïdes au sein des lésions actives cérébrales chez les patients atteints de SEP

Analyse par microscopie confocale de lésions actives de SEP de l'expression de Ninjurin-1 (vert) et des CPA CMH II⁺ (rouge, panneaux du haut) ou des macrophages CD68⁺ (rouge, panneaux centraux) ou des DC DC-SIGN (rouge, panneaux du bas) dans du matériel post-mortem du SNC humain. La co-localisation de Ninjurin-1 (vert) et des CPA (rouge) est observée dans les panneaux de droite avec la coloration du noyau avec le TO-PRO-3 (bleu). Les images montrées sont représentatives de >20 champs obtenus d'immunohistocolorations effectuées sur 12 lésions actives à partir de matériel congelé du SNC de trois patients atteints de SEP. Barre d'échelle: 30 μ m.

5. La neutralisation de Ninjurin-1 restreint la migration des monocytes humains CD14⁺ à travers les CE-BHE humaines

Maintenant que l'expression de Ninjurin-1 a été établie sur les CPA myéloïdes qui ont infiltré le SNC dans le contexte de l'EAE et de la SEP, le rôle de Ninjurin-1 a été évalué dans la transmigration *in vitro* des leucocytes à travers les CE-BHE. Ninjurin-1 médie une adhérence de type homophile (Araki et al., 1997) et nos résultats démontrent qu'elle est exprimée sur les cultures primaires de CE-BHE humaines et par les CPA myéloïdes. D'une part, le modèle *in vitro* de la BHE humaine a été utilisé à l'aide de la chambre de Boyden modifiée (**Schéma 4**) (Prat et al., 2002). Dans la chambre du haut, une monocouche de CE-BHE a été mise en culture primaire sur une membrane poreuse recouverte de gélatine, pour mimer la matrice extracellulaire. Également, le milieu de culture utilisé a été supplémenté avec du milieu conditionné par les astrocytes pour mimer l'environnement physiologique de la BHE. D'autre part, le peptide synthétique de 12 acides aminés bloquant dirigé contre le motif d'adhérence de Ninjurin a été utilisé. Tel que rapporté par Araki, ce peptide se lie et neutralise le motif d'adhérence de Ninjurin-1 qui est situé entre les acides aminés 26 et 37 (appelé Ninj₂₆₋₃₇) de la protéine. Le prétraitement d'une monocouche confluente de CE-BHE avec le peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ (0,4 mM) a significativement réduit la transmigration des monocytes CD14⁺ *ex vivo* et ce comparé aux CE-BHE prétraitées avec le peptide contrôle (0,4 mM) (**Figure 12**). Par ailleurs, l'effet bloquant du peptide Ninj₂₆₋₃₇ est spécifique aux cellules de la lignée myéloïde, car la migration de lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ n'est pas affectée dans ce même modèle (**Figure 13**), probablement puisque l'expression de Ninjurin-1 sur les lymphocytes T est faible (**Figures 5 et 6**). De plus, le prétraitement de la monocouche des CE-BHE en présence d'un anticorps anti-Ninjurin-1 (10 µg/ml) a engendré un effet sur la transmigration des monocytes similaire au peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ et ce comparé à son contrôle isotypique (10 µg/ml) (**Figure 14**, $P < 0,05$). Lors de la transmigration des leucocytes, Carman et Springer ont observé un réarrangement des molécules d'adhérence au niveau de la membrane des leucocytes pour permettre leur passage à travers l'endothélium vasculaire (Carman and Springer, 2004) lors de la diapédèse et forment une

« coupe transmigratoire ». Une reconstruction de l'axe Z (X-Z et Y-Z) par microscopie confocale a permis l'observation de l'interaction homophile médiée par Ninjurin-1 (rouge) entre les monocytes CD14⁺ marqués au CFSE et les CE-BHE (**Figure 15**). Ninjurin-1 est parallèlement positionné autour des monocytes possiblement pour favoriser leurs passages à travers les CE-BHE. Ainsi, ces données démontrent l'importance de Ninjurin-1 et l'importance de son interaction de type homophile dans la transmigration des monocytes à travers les CE-BHE *in vitro* et suggèrent que Ninjurin-1 est impliquée dans la migration des CPA myéloïdes au sein du SNC *in vivo*.

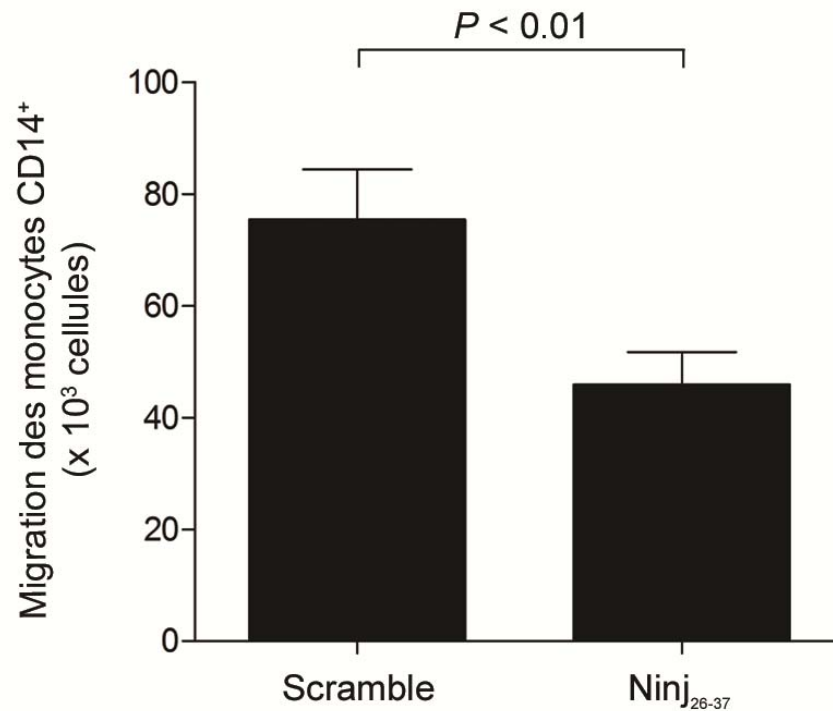


Figure 12 : La neutralisation *in vitro* de Ninjurin-1, à l'aide d'un peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇, restreint la migration des monocytes CD14⁺ à travers les CE-BHE humaines

Dans le modèle *in vitro* de la BHE, des monocytes humains CD14⁺ *ex vivo* ont migré à travers une monocouche confluyente de CE-BHE humaines pendant 24 h en présence du peptide bloquant Ninjurin-1 (Ninj₂₆₋₃₇; 0,4 mM) ou du peptide contrôle (0,4 mM). La neutralisation de Ninjurin-1 restreint significativement la migration des monocytes CD14⁺ ($P < 0,01$) à travers les CE-BHE. Les données montrées sont représentatives de sept expériences indépendantes avec le même nombre de donneurs sains et ce effectué en triplicata.

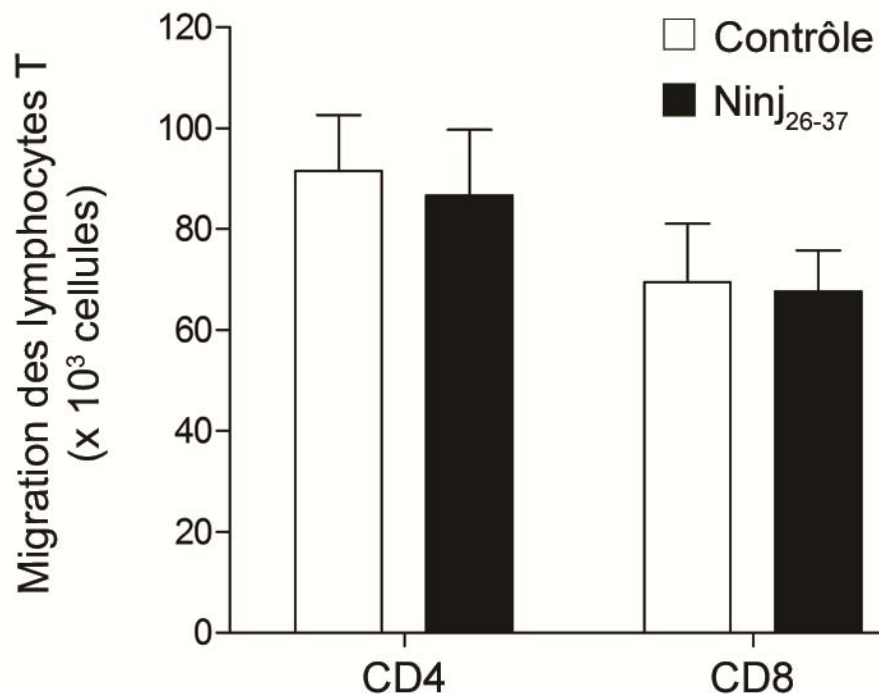


Figure 13 : La neutralisation *in vitro* de Ninjurin-1 n'a aucun effet sur la transmigration des lymphocytes humains à travers les cultures primaires de CE-BHE humaines

Dans le modèle *in vitro* de la BHE, à l'aide de la chambre de Boyden modifiée, des lymphocytes humains CD4⁺ ou CD8⁺ *ex vivo* ont migré à travers une monocouche confluente de CE-BHE humaines pendant 24 h en présence du peptide bloquant Ninjurin-1 (Ninj₂₆₋₃₇; 0,4 mM) ou du peptide contrôle (0,4 mM). La neutralisation de Ninjurin-1 n'a aucun effet sur la migration des lymphocytes CD4⁺ ou CD8⁺ à travers les CE-BHE humaines. Les données montrées sont représentatives de trois (CD8⁺) et sept (CD4⁺) expériences indépendantes avec le même nombre de donneurs sains et ce effectué en triplicata.

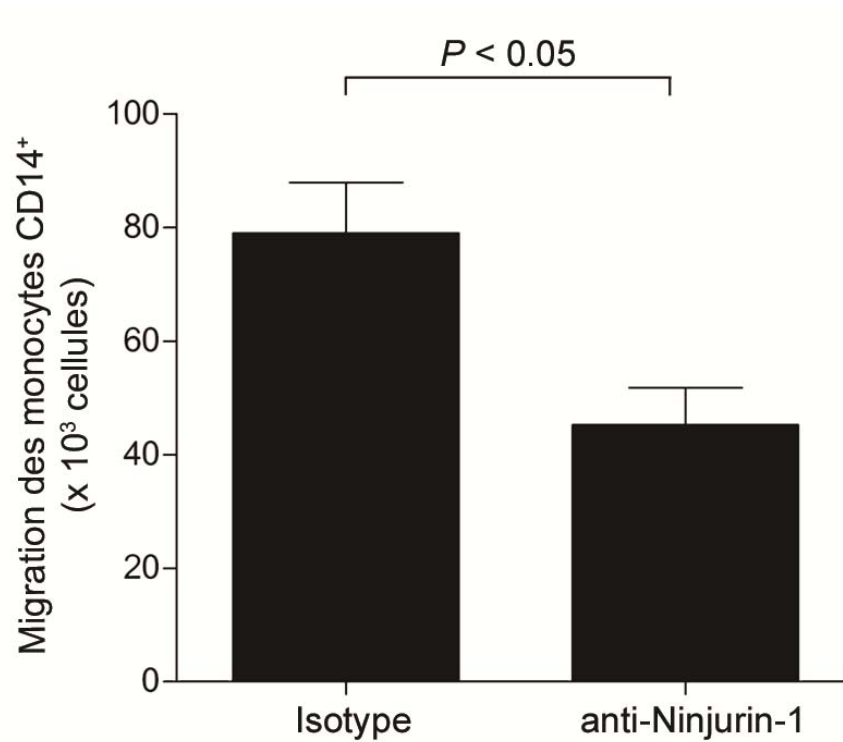


Figure 14 : La neutralisation *in vitro* de Ninjurin-1, à l'aide d'un anticorps anti-Ninjurin-1, restreint la migration des monocytes CD14⁺ à travers les CE-BHE humaines

Dans le modèle *in vitro* de la BHE, des monocytes humains CD14⁺ *ex vivo* ont migré à travers une monocouche confluente de CE-BHE humaines pendant 24 h en présence de l'anticorps anti-Ninjurin-1 (10 µg/ml) ou de son contrôle isotypique (10 µg/ml). La neutralisation de Ninjurin-1 restreint significativement la migration des monocytes CD14⁺ ($P < 0,05$) à travers les CE-BHE humaines. Les données montrées sont représentatives de trois expériences indépendantes avec le même nombre de donneurs sains et ce effectué en triplicata.

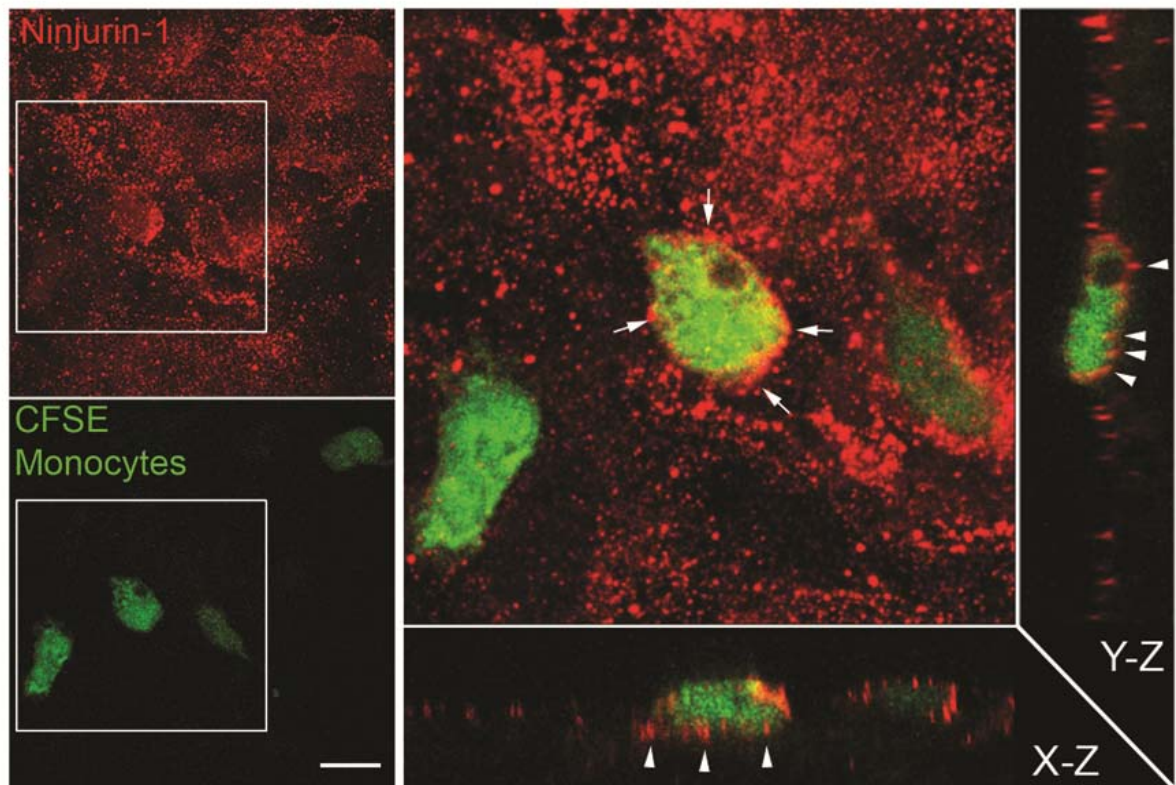


Figure 15 : Ninjurin-1 s'accumule autour des monocytes lors de la transmigration à travers les CE-BHE humaines

Des monocytes humains $CD14^+$ marqués au (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*) CFSE (vert) ont été déposés sur une monocouche confluente de cultures primaires de CE-BHE humaines préalablement traitées en présence des cytokines pro-inflammatoires TNF et IFN- γ (100 U/ml, 8 h). Les cellules ont été fixées et immunocolorées pour observer l'expression de Ninjurin-1 (rouge, panneaux de gauche). Une reconstruction de l'axe Z de 15 μm (x-z et y-z) montre la localisation de Ninjurin-1 (rouge, flèches) autour des monocytes migrants marqués au CFSE (vert) et dans la coupe transmigrationire (flèches) au niveau des CE-BHE. Les données montrées sont représentatives de >20 champs obtenus à partir de quatre immunocolorations indépendantes effectuées avec quatre donneurs sains et deux préparations de CE-BHE différentes. Barre d'échelle: 20 μm .

6. La neutralisation de Ninjurin-1 n'a aucun effet sur la perméabilité des CE-BHE

Certaines protéines jonctionnelles de la BHE, telles que la protéine des jonctions serrées *junctional adhesion molecule* (JAM)-A qui médie à la fois une adhérence de type homophile entre les cellules endothéliales et joue un rôle dans la transmigration des monocytes (Martin-Padura et al., 1998). Étant donné que Ninjurin-1 médie également une adhérence de type homophile et qu'elle est exprimée sur les CE-BHE, le rôle de Ninjurin-1 a été étudié pour observer sa contribution dans la perméabilité des CE-BHE en tant que protéine des jonctions serrées potentielle. Le modèle *in vitro* de la BHE a été utilisé pour mesurer la perméabilité des CE-BHE. Cette dernière a été déterminée par la diffusion du traceur soluble, l'albumine de sérum bovin (BSA - *bovine serum albumin*), conjugué au fluorochrome *Fluorescein isothiocyanate* (FITC). Les CE-BHE en croissance ont été traitées en présence du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ (0,4 mM) ou du peptide contrôle (0,4 mM). Ensuite, la BSA-FITC a été ajoutée dans la chambre du haut et sa diffusion dans la chambre du bas par rapport à la chambre du haut a été mesurée à différents intervalles de temps, soit à 0, 2, 4, 12, 24, 48 et 72 h suivant l'addition du traceur soluble conjugué. La présence du peptide bloquant n'a pas eu d'effet sur le pourcentage de diffusion de la BSA-FITC et sur la perméabilité de la BHE (**Figure 16**). Cette expérience démontre que Ninjurin-1 n'est probablement pas une protéine des jonctions serrées et qu'elle ne participe pas à la formation de la BHE.

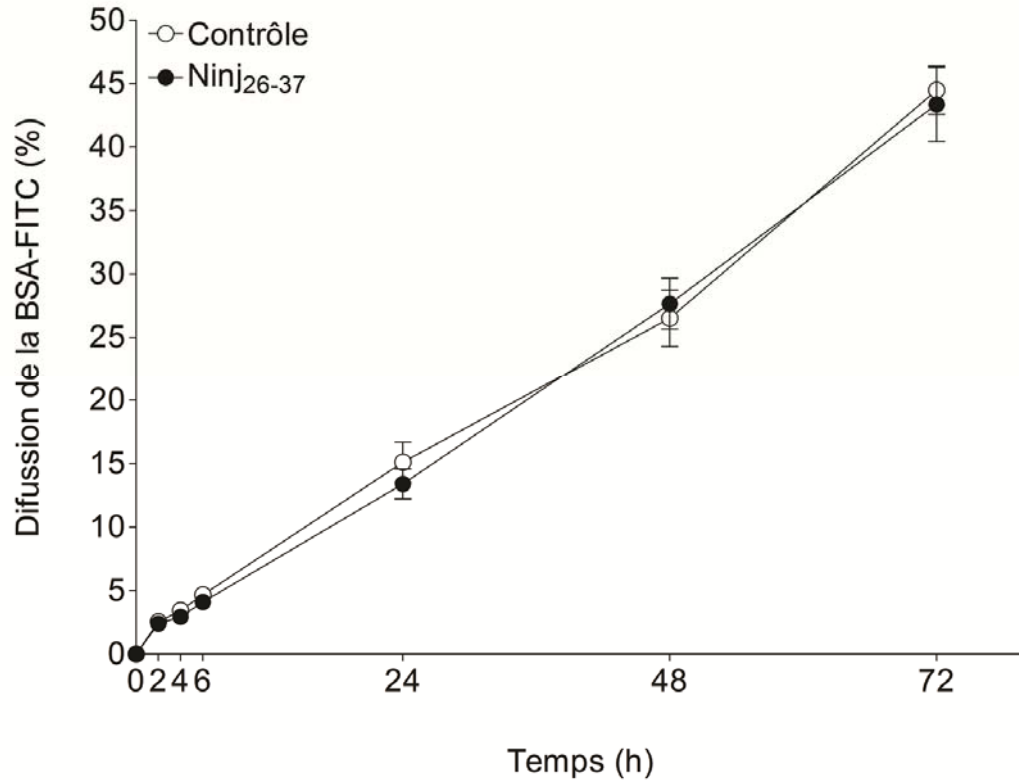


Figure 16 : La neutralisation *in vitro* de Ninjurin-1 n'a pas d'effet sur la perméabilité de la BHE humaine

À l'aide de la chambre de Boyden modifiée, des CE-BHE ont été mises en cultures primaires en présence du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ (0,4 mM) ou du peptide contrôle (0,4 mM) dans la chambre du haut du modèle *in vitro* de la BHE. Le traceur soluble conjugué à un fluorochrome (BSA-FITC; 50 µg/ml) a été ajouté dans la chambre du haut. À 0, 2, 6, 24, 48 et 72 heures suivant l'addition du traceur conjugué, le pourcentage de diffusion de la BSA-FITC a été mesuré dans la chambre du bas par rapport à la chambre du haut. Ninjurin-1 n'a pas d'effet sur la perméabilité des CE-BHE humaines. Les données montrées représentent trois expériences indépendantes effectuées sur trois préparations de CE-BHE différentes et ce effectué en triplicata.

7. *Ninjurin-1 n'affecte ni l'activation et ni la prolifération des lymphocytes T*

La présentation antigénique est un phénomène important pour l'initiation et le maintien d'une réponse immunitaire. L'interaction des CPA et des lymphocytes T, par l'intermédiaire du CMH de classe II et du complexe récepteur des cellules T (RCT)-CD3 est accompagnée de signaux de costimulation pour permettre une activation complète des lymphocytes T. D'ailleurs, l'interaction entre la molécule d'adhérence ICAM-1 et l'intégrine *lymphocyte function-associated antigen* (LFA)-1 y joue aussi un rôle, car ces molécules permettent de stabiliser l'interaction entre les CPA et les lymphocytes T (Dang et al., 1990). Conséquemment, il est important de déterminer si Ninjurin-1 pourrait jouer un rôle dans cette interaction. Suivant le marquage au *Carboxyfluorescein succinimidyl ester* (CFSE) des PBMC, les lymphocytes ont été activés de façon non-spécifique en présence de l'anticorps soluble anti-CD3 et de l'IL-2 recombinant pendant 6 jours. Pour observer l'effet de la neutralisation du motif d'adhérence de Ninjurin-1, les PBMC ont été traitées en présence du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ (0,4 mM) ou du peptide contrôle (0,4 mM). L'analyse par cytométrie de flux des PBMC traitées avec le bloquant Ninj₂₆₋₃₇ n'a démontré aucune différence dans la dilution du CFSE incorporé dans les lymphocytes T CD3⁺ qui ont proliféré et ce comparé avec le peptide contrôle (**Figure 17**). De plus, l'expression du marqueur d'activation CD25, soit le récepteur de l'IL-2 exprimé par les lymphocytes T CD3⁺, n'est pas modifiée en présence du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ (**Figure 18**). Ceci démontre que la neutralisation *in vitro* de Ninjurin-1 n'a aucun effet sur l'activation et la prolifération des lymphocytes T.

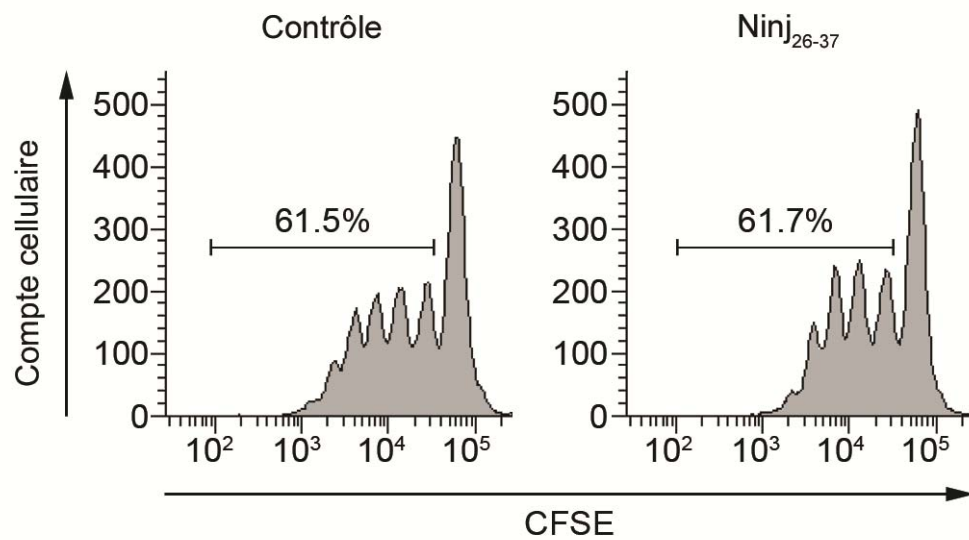


Figure 17 : Ninjurin-1 n'affecte pas la prolifération des lymphocytes T humains

Activation non-spécifique des lymphocytes T $CD3^+$ humains, marquées au (*carboxyfluorescein succinimidyl ester*) CFSE, en présence du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ (0,4 mM) ou du peptide contrôle (0,4 mM). La neutralisation de Ninjurin-1 n'a pas d'effet sur la dilution du CFSE dans les lymphocytes T humains activés. Les données montrées sont représentatives de trois expériences indépendantes obtenues à partir de trois donneurs sains.

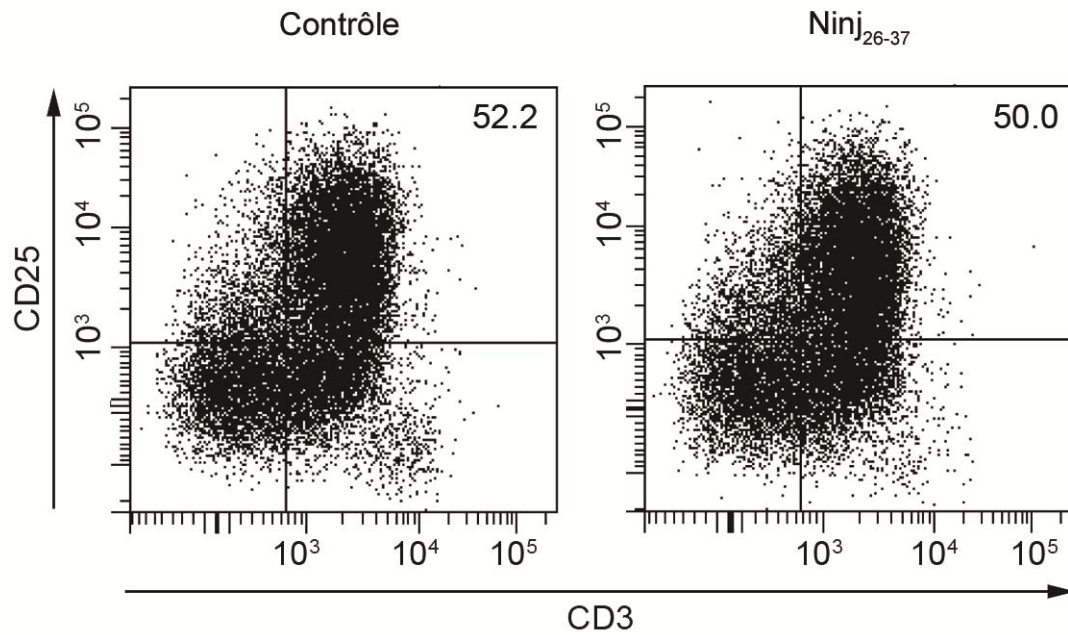


Figure 18 : Ninjurin-1 n'affecte pas l'activation des lymphocytes T humains

Analyse par cytométrie de flux de l'expression de CD3 et du marqueur d'activation CD25 sur les lymphocytes T humains activés de manière non-spécifique en présence du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ (0,4 mM) ou du peptide contrôle (0,4 mM). Ninjurin-1 n'affecte pas l'expression du marqueur d'activation CD25 sur les lymphocytes T CD3⁺ activés. Les données montrées sont représentatives de trois expériences indépendantes obtenues à partir de trois donneurs sains.

8. La neutralisation *in vivo* de Ninjurin-1 améliore les scores cliniques des souris atteintes d'EAE et réduit l'infiltration des CPA myéloïdes au sein du SNC

L'initiation, la persistance et la récurrence de l'inflammation au sein du SNC dans l'EAE dépend en grande partie de la présence de CPA professionnelles dans le SNC (McMahon et al., 2005). En effet, Huitinga *et al.*, Tran *et al.* ainsi que King *et al.* ont démontré que la déplétion systémique des monocytes résulte en une diminution importante dans le développement et la sévérité de l'EAE (Huitinga et al., 1995; Tran et al., 1998). Ninjurin-1 a un effet sur le recrutement des monocytes CD14⁺ humains à travers les CE-BHE *in vitro*, sans affecter le recrutement des lymphocytes T. Pour évaluer le rôle de Ninjurin-1 dans le développement de l'EAE, les souris de la souche C57BL/6 ont été immunisées de façon active en présence du peptide *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG)₃₅₋₅₅ et de l'adjuvant complet de Freund (CFA) administrés de façon sous-cutanée au jour 0. Ces souris développent une maladie monophasique chronique avec des symptômes ascendants. Deux injections intra-péritonéales par jour du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ (200 µg/injection) ont été administrées aux souris du jour 3 au jour 23 post-immunisation. Le groupe témoin a reçu des injections du peptide contrôle (200µg/injection, 2 injections/jour) qui ont été administrées de la même manière. La courbe des scores cliniques des souris traitées en présence du peptide bloquant a démontré une réduction significative des signes neurologiques et des symptômes et ce comparé aux souris du groupe contrôle (**Figure 19**, $P < 0,05$, $n=8$, 2 expériences indépendantes). D'ailleurs, le nombre de souris qui ont atteint un score clinique de 3 ou plus est inférieur chez les souris traitées avec le peptide Ninj₂₆₋₃₇ comparé au groupe contrôle (**Tableau I**).

Pour vérifier l'effet de l'administration du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ sur la pathologie de l'EAE, des analyses histopathologiques ont été effectuées. D'une part, les deux paramètres importants dans le développement de l'EAE ont été évalués. La démyélinisation et l'infiltration de cellules immunitaires ont été déterminées par la coloration du tissu congelé du SNC (moelle épinière) avec le *Luxol Fast Blue* et l'hématoxyline & l'éosine. Ces colorations ont démontré que

l'administration du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ diminue l'ampleur de la démyélinisation (**Figure 20**). Il est intéressant de noter que l'infiltration des cellules au sein du SNC des souris atteintes d'EAE est restreinte principalement aux méninges par rapport à la plupart des cellules infiltrantes des souris du groupe témoin qui ont atteint le parenchyme de la moelle épinière (**Figure 20**). De plus, une diminution de l'infiltration dans le SNC des souris traitées avec le bloquant Ninj₂₆₋₃₇ est observée et ce comparé aux souris du groupe contrôle (**Figure 20**). D'une autre part, grâce à l'immunohistofluorescence et à la microscopie confocale une diminution des CPA CMH II⁺, des DC CD11c⁺ et des macrophages F4/80⁺ infiltrant la moelle épinière des souris atteintes d'EAE traitées avec le peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ est également observée et ce comparé au groupe contrôle (**Figure 21**). Il est intéressant de noter que les cellules infiltrantes dans la moelle épinière des souris traitées avec le peptide Ninj₂₆₋₃₇ sont restreintes à la périphérie de la moelle épinière, soit dans les méninges. Ainsi, l'administration du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ semble empêcher l'entrée des CPA dans le parenchyme de la moelle épinière. Une analyse semi-quantitative du nombre des CPA CMH II⁺, des DC CD11c⁺ et des macrophages F4/80⁺ infiltrants a permis de confirmer qu'il y a une diminution significative de ces cellules dans les moelles épinières des souris atteintes d'EAE chez les souris traitées avec le peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ (**Figure 22**). Ces données démontrent que la molécule d'adhérence Ninjurin-1 et son motif d'adhérence sont impliqués dans la transmigration des CPA myéloïdes au sein du SNC des souris atteinte d'EAE et que sa neutralisation affecte le développement de la pathologie.

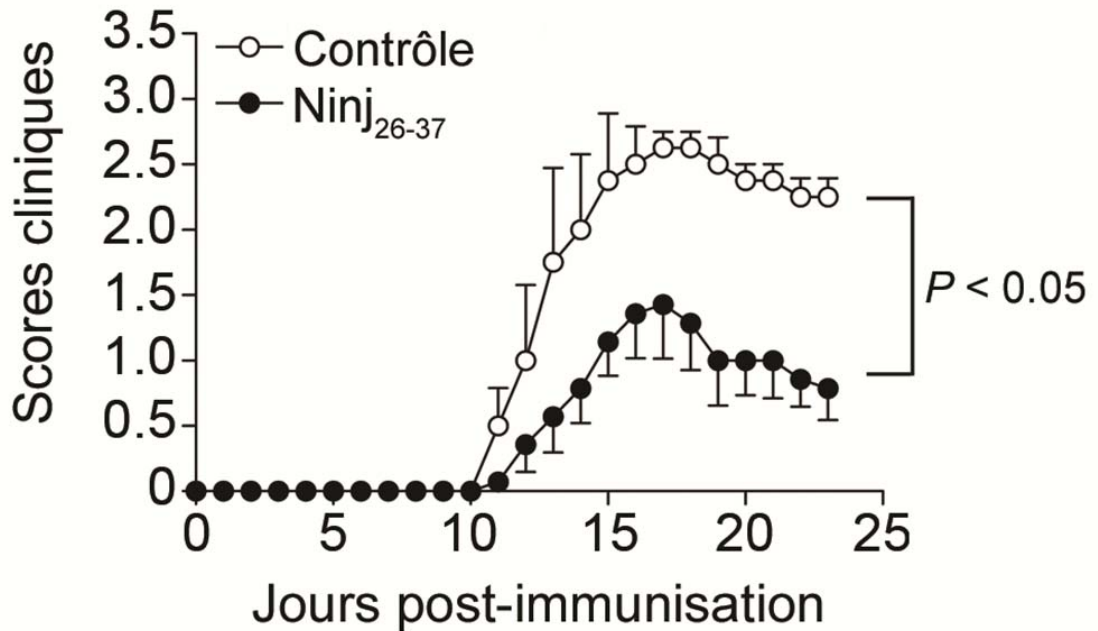


Figure 19 : La neutralisation *in vivo* de Ninjurin-1 améliore les scores cliniques des souris atteintes d'EAE

L'EAE a été induite par immunisation active chez les souris C57BL/6 avec le peptide MOG₃₅₋₅₅ et l'adjuvant complet de Freund (CFA). Le peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ a été injecté de façon intra-péritonéale (●; 200 µg/injection, 2 injections/jour) du jour 3 au jour 23 post-immunisation. Les animaux du groupe contrôle ont reçu le peptide contrôle de la même manière (○, Ninj₂₆₋₃₇; 200 µg/injection, 2 injections/jour). Les souris traitées avec le bloquant Ninj₂₆₋₃₇ (●) montrent une réduction significative des scores cliniques comparés aux animaux contrôles (○). Les données montrées sont représentatives de deux expériences indépendantes obtenues à partir de huit souris par groupe.

Tableau I: Diminution de la sévérité de la maladie chez les souris atteintes d'EAE traitées avec le peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇

Groupes	Score Clinique d'EAE $\geq 3,0$						
	Jour 11	Jour 12	Jour 13	Jour 14	Jour 15	Jour 16	Jour 17
Contrôle	0/8	0/8	4/8*	4/8*	4/8*	4/8*	4/8*
Ninj ₂₆₋₃₇	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8	0/8

Les souris de la souche C57BL/6 ont été immunisées de façon active en présence du peptide *myelin oligodendrocyte glycoprotein* (MOG)₃₅₋₅₅ et de l'adjuvant complet de Freund (CFA) qui ont été administrés de façon sous-cutanée au jour 0. Les souris ont reçu deux injections intra-péritonéales par jour du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ (200 µg/injection) du jour 3 au jour 23 post-immunisation. Le groupe témoin a reçu des injections du peptide contrôle qui ont été administrées de la même manière. Ces données représentent les souris ayant un score clique de $\geq 3,0$, du jour 11 à 17, sur le nombre total d'animaux analysés ($n = 8$; *, $P < 0.05$; 2 expériences indépendantes).

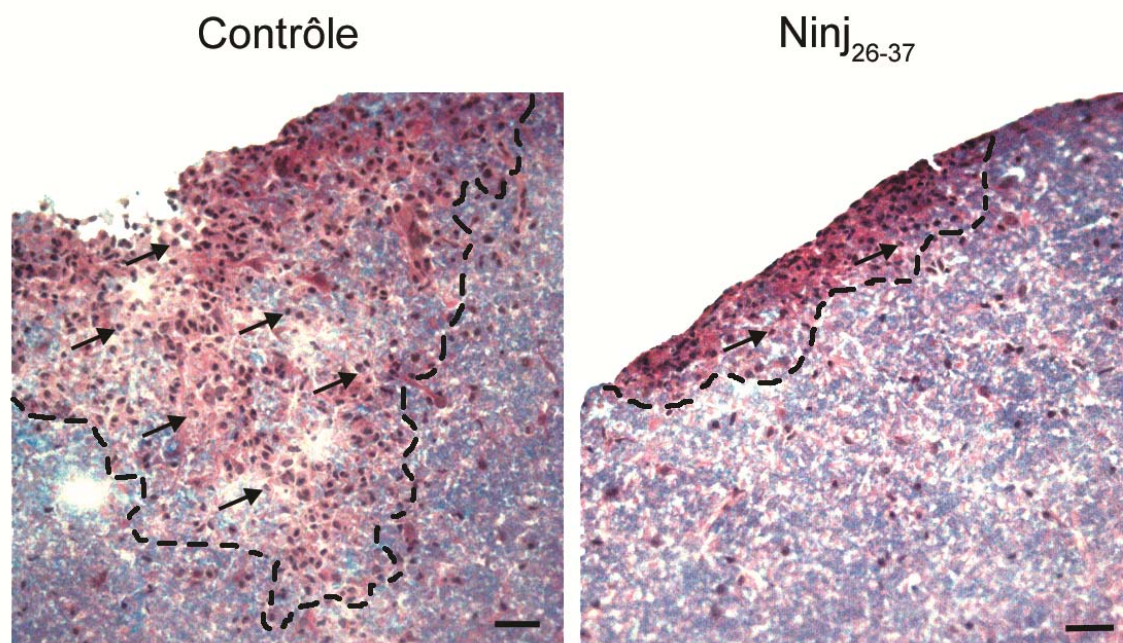


Figure 20 : La neutralisation *in vivo* de Ninjurin-1 réduit l'infiltration de cellules immunitaires et la démyélinisation au sein du SNC des souris atteintes d'EAE

L'EAE a été induite par immunisation active chez les souris C57BL/6 avec le peptide MOG₃₅₋₅₅/CFA. Le peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ a été injecté de façon intra-péritonéale (Ninj₂₆₋₃₇; 200 µg/injection, 2 injections/jour) du jour 3 au jour 23 post-immunisation. Les animaux du groupe contrôle ont reçu le peptide contrôle de la même manière (contrôle, Ninj₂₆₋₃₇; 200 µg/injection, 2 injections/jour). Une coloration au *Luxol Fast Blue* et à l'Hématoxyline & l'Éosine a été effectuée sur des moelles épinières congelées (jour 14 post-immunisation; scores cliniques de 4 et 3 pour les souris traitées avec le peptide contrôle et le bloquant Ninj₂₆₋₃₇, respectivement). Les souris atteintes d'EAE traitées avec le peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ montrent une réduction des cellules immunitaires infiltrantes (flèches) et une réduction de la démyélinisation (région délimitée par la ligne pointillée) et ce comparé au groupe contrôle. La ligne pointillée définit la région démyélinisée. Les données montrées sont représentatives de >20 champs de matériel post-mortem congelé de quatre animaux au pic de la maladie (jour 14 post-immunisation) de deux expériences indépendantes obtenues de huit souris par groupe. Barres d'échelle: 50 µm.

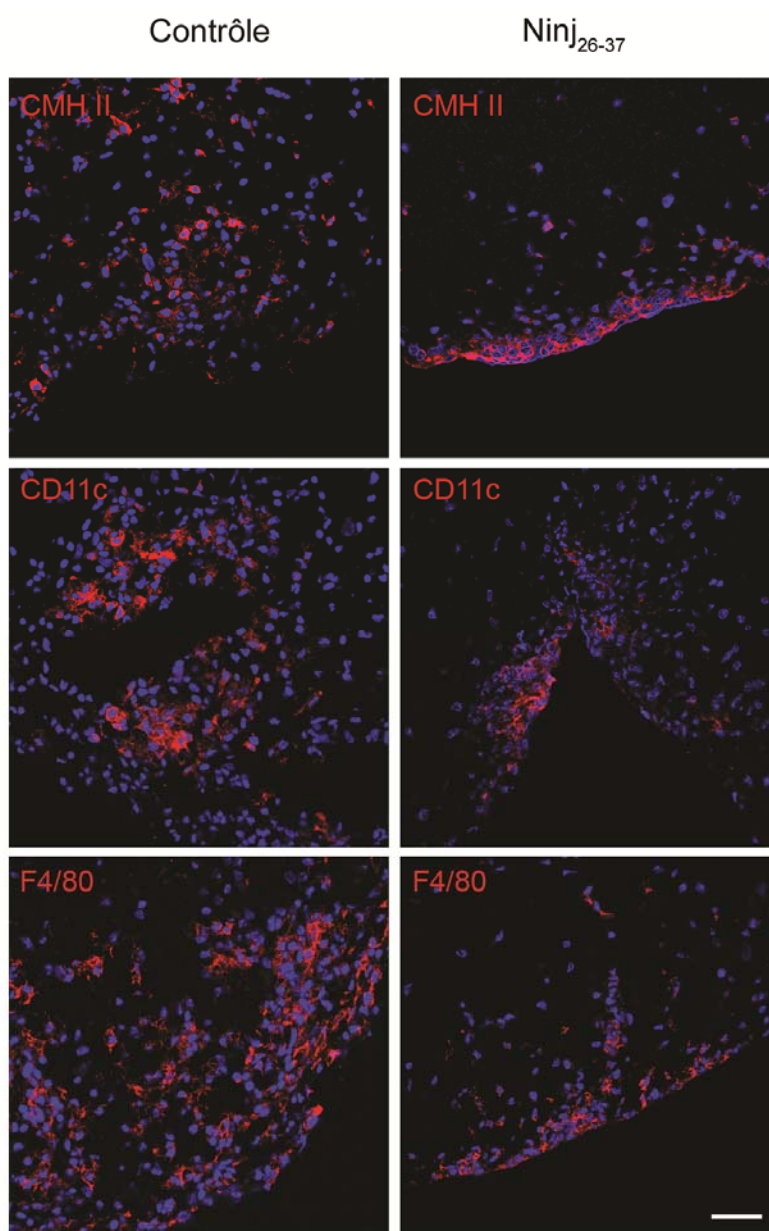


Figure 21 : La neutralisation *in vivo* de Ninjurin-1 réduit l'infiltration des CPA myéloïdes au sein du SNC des souris atteintes d'EAE

L'EAE a été induite par immunisation active chez les souris C57BL/6 avec le peptide MOG₃₅₋₅₅/CFA. Le peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ ou le peptide contrôle ont été injectés de façon intra-péritonéale (200 µg/injection, 2 injections/jour) du jour 3 au jour 23 post-immunisation. L'analyse des immunohistocolorations des moelles épinières (jour 14 post-immunisation; scores cliniques de 4 et 3 pour les souris traitées avec le peptide contrôle et le bloquant Ninj₂₆₋₃₇, respectivement) confirme la réduction des CPA CMH II⁺ (rouge, panneaux du haut), des macrophages F4/80⁺ (rouge, panneaux centraux) et des DC CD11c⁺ (rouge, panneaux du bas) chez les souris traitées avec le peptide Ninj₂₆₋₃₇ et ce comparé au groupe contrôle. Les noyaux sont immunocolorés avec le TO-PRO-3 (bleu). Les données montrées sont représentatives de >20 champs de matériel post-mortem congelé de quatre animaux au pic de la maladie (jour 14 post-immunisation). Barres d'échelle: 30 µm

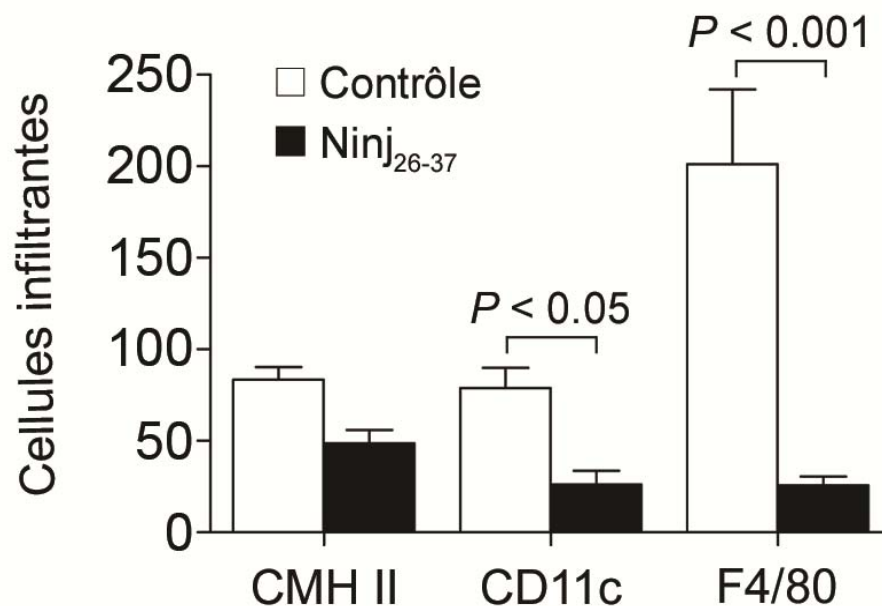


Figure 22 : La neutralisation *in vivo* de Ninjurin-1 réduit significativement l'infiltration des CPA myéloïdes au sein du SNC des souris atteintes d'EAE

L'EAE a été induite par immunisation active chez les souris C57BL/6 avec le peptide MOG₃₅₋₅₅/CFA. Le peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ ou le peptide contrôle ont été injecté de façon intra-péritonéale (200 µg/injection, 2 injections/jour) du jour 3 au jour 23 post-immunisation. L'analyse semi-quantitative du nombre de cellules infiltrantes dans les immunohistocolorations des moelles épinières des souris traitées avec le peptide Ninj₂₆₋₃₇ comparé aux souris contrôles montrées dans la **Figure 21** (jour 14 post-immunisation; scores cliniques de 4 et 3 pour les souris traitées avec le peptide contrôle et le bloquant Ninj₂₆₋₃₇, respectivement) démontrent une réduction significative des macrophages F4/80⁺ ($P < 0,001$) et DC CD11c⁺ ($P < 0,05$) chez les souris traitées avec le bloquant Ninj₂₆₋₃₇ et ce comparé a groupe contrôle. Les données montrées sont représentatives de >20 champs de matériel post-mortem congelé de quatre animaux au pic de la maladie (jour 14 post-immunisation).

DISCUSSION ET CONCLUSION

La migration des cellules immunitaires au sein du système nerveux central (SNC) est une étape cruciale menant à leur accumulation et à l'inflammation cérébrale chez les patients atteints de sclérose en plaques (SEP). Cette maladie chronique de nature auto-immune se caractérise par des lésions inflammatoires démyélinisantes et par des dommages axonaux dans le SNC qui sont associés à la fragilisation de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Plusieurs facteurs, dont les molécules d'adhérence, sont impliqués dans le recrutement des leucocytes au sein du SNC et dans leur transmigration à travers la BHE. Suite à une analyse par protéomique effectuée sur des cellules endothéliales de la BHE (CE-BHE) humaine, *Nerve injury-induced protein* (Ninjurin)-1 a été identifiée comme candidat potentiellement impliqué dans le recrutement des leucocytes vers le SNC. Ninjurin-1 a été décrite comme une molécule d'adhérence qui facilite la régénération neuronale de façon homotypique (Ninjurin-1-Ninjurin-1) dans le système nerveux périphérique (SNP) (Araki et al., 1997). Dans le présent mémoire, les expériences qui ont été effectuées portent sur le rôle spécifique de Ninjurin-1 dans la transmigration de cellules présentatrices d'antigène (CPA) myéloïdes, au niveau de la BHE et au sein du SNC.

D'une part l'expression et la régulation de Ninjurin-1 ont été analysées dans les CE-BHE humaines, ainsi que dans les leucocytes humains et murins. Ninjurin-1 est exprimée par les CE cérébrales humaines *in vitro* et *in situ* et son expression augmente dans un contexte inflammatoire. L'augmentation de l'expression de Ninjurin-1 est accompagnée de son accumulation dans les radeaux lipidiques (RL) des CE-BHE traitées en présence de cytokines pro-inflammatoires. Dans un contexte inflammatoire, l'expression de différentes molécules d'adhérence telle qu'*intercellular adhesion molecule-1* (ICAM-1) et *vascular cell adhesion molecule-1* (VCAM-1), deux molécules de la superfamille des immunoglobulines qui sont exprimées à la surface des CE-BHE, augmente sur l'endothélium vasculaire pour permettre l'acheminement des différents leucocytes au site inflammatoire (Man et al., 2007; Engelhardt et al., 1997; Steffen et al., 1994; Bo et al., 1996; Washington et al., 1994; Cannella and Raine, 1995). Ainsi, tenant compte de la similarité d'expression entre Ninjurin-1 et ICAM-1, l'hypothèse générale a été que Ninjurin-1

serait possiblement impliquée dans le recrutement des cellules immunitaires au sein du SNC. Ninjurin-1 est également exprimée par différents leucocytes humains et murins, mais préférentiellement par les CPA myéloïdes, soit les monocytes CD14⁺, les macrophages et les cellules dendritiques (DC). D'ailleurs, il y a une corrélation entre l'expression de Ninjurin-1 et l'état de différenciation des monocytes et des CPA myéloïdes. Dans les lésions actives au sein du SNC des patients atteints de SEP et des souris atteintes d'EAE, les CPA myéloïdes retrouvées expriment des niveaux élevés de Ninjurin-1. Ainsi, le profil d'expression de Ninjurin-1 sur l'endothélium et sur les différents leucocytes de la lignée myéloïde ainsi que son adhérence de type homophilique suggèrent que cette molécule d'adhérence jouerait un rôle dans le recrutement des monocytes et des CPA myéloïdes au sein du SNC. Récemment, une étude réalisée par le groupe de Kyu-Won Kim a évalué l'expression de Ninjurin-1 dans l'EAE induite chez le rat (Ahn et al., 2009). Ils ont démontré que l'expression de Ninjurin-1 augmente dans le SNC (cerveau) et le sang des rats atteints d'EAE (Ahn et al., 2009). De plus, ils ont observé que Ninjurin-1 est exprimée dans l'endothélium vasculaire, dans les cellules myéloïdes (monocytes et macrophages) et non sur les cellules lymphoïdes (lymphocytes T et B) ayant infiltrés le SNC des rats atteints d'EAE, confirmant ainsi le profil d'expression de Ninjurin-1 qui a été observé dans cette présente étude.

D'une autre part, le rôle fonctionnel de Ninjurin-1 a été étudié au niveau de la BHE humaine dans la transmigration de différents leucocytes, dans la perméabilité des CE-BHE et il a également été étudié au niveau de la l'activation des lymphocytes T. Grâce au modèle *in vitro* de la BHE humaine, l'efficacité du peptide synthétique neutralisant le motif d'adhérence de Ninjurin-1 (Ninj₂₆₋₃₇) a réduit spécifiquement la migration des monocytes CD14⁺ à travers une monocouche de CE-BHE, sans affecter la migration des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺. Un anticorps anti-Ninjurin-1 a aussi eu le même effet sur la migration transendothéliale des monocytes. La neutralisation de Ninjurin-1 affecte ainsi la transmigration d'une sous-population particulière de leucocytes, soit les CPA myéloïdes. Certaines molécules d'adhérence jonctionnelles des CE-BHE, telle JAM-A qui médie une adhérence de type homophilique, jouent aussi un rôle dans

la transmigration des monocytes et dans la perméabilité des CE-BHE (Martin-Padura et al., 1998). Ninjurin-1 ne serait pas une protéine des jonctions serrées des CE-BHE, étant donné que la neutralisation de son motif d'adhérence n'a pas d'effet sur la perméabilité des CE-BHE, tel qu'évalué *in vitro* dans notre modèle. Ainsi, le rôle de Ninjurin-1 est spécifique à la migration des monocytes CD14⁺. Enfin, Anh *et al.* ont suggéré que Ninjurin-1 pourrait jouer un rôle dans la transmigration des cellules de la lignée myéloïde à travers la BHE, suite à l'observation de la forte adhérence entre les CE de la micro-vascularisation du cerveau humain (similaires aux CE-BHE) et les cellules de la lignée cellulaire BV2 (monocytes murins) surexprimant Ninjurin-1 (Ahn et al., 2009). Aucune étude fonctionnelle n'a été effectuée pour démontrer leur hypothèse. Le travail effectué au sein du laboratoire du Dr. Prat démontre le rôle important et spécifique que joue Ninjurin-1 dans la migration transendothéliale des monocytes, qui sont considérés comme étant les précurseurs des macrophages et des DC. Par ailleurs, des expériences effectuées suggèrent aussi que l'adhérence homophile de Ninjurin-1 entre les CPA et les lymphocytes ne parvient pas à stabiliser l'interaction de ces deux cellules et ne semble pas participer à l'activation et à la prolifération des lymphocytes T. Conséquemment Ninjurin-1 ne semble pas être une molécule de costimulation, tel que précédemment démontré pour d'autres molécules d'adhérence comme ICAM-1 (Dang et al., 1990). Enfin, la neutralisation de Ninjurin-1 chez la souris atteinte d'EAE a été effectuée pour étudier l'effet sur le recrutement *in vivo* de leucocytes vers le SNC. Une réduction significative de la sévérité de la maladie a été observée chez les souris atteintes d'EAE et traitées avec le bloquant Ninj₂₆₋₃₇, par rapport au groupe contrôle. Les analyses histopathologiques du SNC de ces souris confirment une importante réduction du dommage tissulaire et de l'infiltration des CPA myéloïdes chez les animaux traités avec Ninj₂₆₋₃₇ et ce comparé au groupe contrôle. Dans la SEP et l'EAE, les CPA myéloïdes sont importantes au sein du SNC, puisque qu'elles permettent le recrutement de cellules inflammatoires et la réactivation des lymphocytes T. Plusieurs études démontrent le rôle crucial des cellules myéloïdes et de leurs molécules d'adhérence dans la neuroinflammation et dans la destruction tissulaire (Greter et al., 2005; King et al., 2009). Enfin, ces résultats permettent d'établir que Ninjurin-1 est une nouvelle molécule d'adhérence de la BHE humaine et animale

jouant un rôle important et spécifique dans le recrutement des CPA myéloïdes au sein du SNC.

La migration des leucocytes est orchestrée par l'expression de molécules d'adhérence exprimées sur l'endothélium vasculaire et de leurs contre-ligands exprimés par les leucocytes. Par exemple, l'interaction entre les molécules d'adhérence cellulaire des CE-BHE, ICAM-1 et VCAM-1 avec leurs récepteurs leucocytaires respectifs *lymphocyte function-associated antigen* (LFA)-1 et *very late antigen* (VLA)-4 est essentielle pour la transmigration de plusieurs leucocytes au sein du SNC. Le modèle de l'EAE a permis de confirmer plusieurs études *in vitro* concernant l'activation ou la transmigration des leucocytes et a également permis de démontrer le rôle que jouent différentes molécules dans le développement et la sévérité de la maladie. En effet, suite à des études *in vivo*, les quatre traitements suivants ont pu être administrés aux patients atteints de SEP; soit l'interféron (IFN)- β , le Glatiramer Acétate, le Mitoxantrone et le Natalizumab (Korn, 2008; Bennett and Stuve, 2009). L'anticorps monoclonal Natalizumab neutralise l'intégrine $\alpha 4$ (VLA-4) qui est exprimée par les leucocytes et qui se lie à VCAM-1 sur les CE-BHE. Cette intégrine est importante pour la transmigration de la plupart des leucocytes, tels que les lymphocytes T, les monocytes, les DC et les neutrophiles et sa neutralisation bloque le recrutement de tous ces leucocytes incluant ceux qui sont responsables de l'immunosurveillance du SNC. Chez un faible pourcentage des patients traités avec le Natalizumab, la réactivation d'un virus dormant, le JC polyomavirus, a eu lieu et 59 patients ont soufferts de leucoencéphalopathie multifocale progressive (LMP). Huit d'entre eux sont décédés de cette maladie très difficile à contrôler (Clifford et al., 2010). Les effets secondaires rencontrés lors de la neutralisation de VLA-4, une molécule d'adhérence exprimée sur l'ensemble des leucocytes, suggère qu'une neutralisation plus spécifique affectant certains sous-types de leucocytes pourrait présenter les mêmes bénéfices thérapeutiques sans les effets secondaires sérieux rencontrés avec Natalizumab. En outre, une neutralisation spécifique qui n'affecterait pas la migration des lymphocytes CD4 et CD8 permettrait de protéger

le SNC des différentes infections bactériennes, virales ou parasitaires, puisque la réactivation lymphocytaire dans ce cas-ci se fait à travers les CPA résidentes du SNC, les microglies. Ainsi, des études plus approfondies sont nécessaires pour développer des thérapies spécifiques qui bloquent l'entrée d'une sous-population leucocytaire en particulier. Les travaux présentés ici montrent qu'il est possible de neutraliser l'entrée des CPA myéloïdes de façon relativement spécifique et suggèrent que cette thérapie pourrait présenter un bénéfice thérapeutique en SEP.

Dans ce mémoire, la régulation de Ninjurin-1 a principalement été étudiée dans un contexte inflammatoire pour mimer le microenvironnement dans le SNC des patients atteints de SEP. Plusieurs traitements disponibles pour la SEP possèdent des caractéristiques anti-inflammatoires. En effet, il serait intéressant de traiter les CE-BHE en présence de cytokines anti-inflammatoires, telles que l'IFN- β , afin d'observer la régulation de l'expression de Ninjurin-1 sur l'endothélium vasculaire. De plus, l'expression de Ninjurin-1 diminue légèrement en présence de milieu conditionné par les astrocytes. Les astrocytes qui entourent les CE-BHE, sécrètent différents facteurs solubles qui protègent la BHE et contribuent à ses propriétés en diminuant la perméabilité des CE-BHE et en diminuant l'infiltration de cellules immunitaires vers le SNC (Siddharthan et al., 2007). L'étude du profil d'expression des leucocytes présents dans le système périphérique des patients atteints de SEP serait nécessaire pour observer l'expression de Ninjurin-1 chez ces patients. Ainsi, l'évaluation des monocytes CD14⁺ des patients atteints de SEP est importante pour déterminer si l'expression de Ninjurin-1 est plus élevée à la surface membranaire pour favoriser leur recrutement au sein de SNC et le développement subséquent de l'inflammation cérébrale. Le liquide céphalorachidien (LCR) des patients atteints de SEP est également utilisé à des fins de diagnostics et ce combiné avec d'autres tests. En effet, le LCR nous procure une représentation des molécules ou cellules présentes dans le SNC, tels que différents sous-type de leucocytes, des cytokines et des immunoglobulines. Ainsi, l'étude du profil d'expression de Ninjurin-1 sur les leucocytes présents dans le LCR, soit les leucocytes qui ont traversé la BHE et qui ont atteints le SNC des patients atteints de SEP, nous procurera une représentation de la régulation de

Ninjurin-1 chez les patients atteints de SEP. L'évaluation de Ninjurin-1 sur les microglies, des CPA non-professionnelles serait aussi importante pour observer l'expression de cette molécule d'adhérence sur ces CPA résidentes du SNC. L'étude de son expression et de son éventuelle fonction, au niveau des microglies, dans des conditions basales ou des conditions inflammatoires expérimentales sera également intéressante.

Récemment, le laboratoire du Dr. Prat a développé avec le *Knockout Mice Project* (KOMP, NIH) une souris déficiente en Ninjurin-1 (Ninjurin-1^{-/-}). La séquence nucléotidique mutée inclut le motif d'adhérence de Ninjurin-1 (acides aminés 26 à 37) qui est important pour l'adhérence homophile entre les CPA myéloïdes et l'endothélium vasculaire. L'usage de cette souris permettra la confirmation des résultats obtenus dans cette étude chez la souris atteinte d'EAE et permettra d'évaluer le rôle de Ninjurin-1 dans d'autres maladies auto-immunes ou inflammatoires. Il faut mentionner qu'une adhérence de type hétérophilique n'est pas exclue et que Ninjurin-1 pourrait avoir d'autres contre-ligands, élargissant ainsi le rôle qu'elle pourrait jouer dans d'autres maladies, dans d'autres organes et dans d'autres processus pathologiques. L'administration de l'anticorps anti-Ninjurin-1 chez les souris atteintes d'EAE serait également importante pour évaluer si les effets seraient comparables à l'administration du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇, vu qu'un effet a été observé dans la transmigration des monocytes CD14⁺ à travers les CE-BHE. De plus, la majorité des personnes atteintes de SEP ont la forme cyclique (80%) qui est caractérisée par des périodes de rémissions et des périodes de poussées. Tel qu'indiqué plus haut, l'EAE induite chez la souris de la souche SJL avec le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ développent l'EAE de forme cyclique caractérisée par des périodes de rémission et de poussées (Baxter, 2007). L'utilisation de ce modèle serait plus appropriée pour se rapprocher de ce qui se passe chez la majorité des patients atteints de SEP et l'administration du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ ou de l'anticorps anti-Ninjurin-1 pourrait avoir lieu suite à l'apparition des symptômes chez la souris, lorsque la maladie sera établie. Ainsi, l'administration du peptide bloquant ou de l'anticorps bloquant Ninjurin-1 suite à l'apparition des symptômes serait essentielle pour mimer l'administration des

traitements actuels aux patients atteints de SEP vu qu'il y a toujours un approvisionnement de CPA au sein du SNC. Donc, on pourra avoir la chance de diminuer l'infiltration de CPA au sein du SNC. Enfin, des études de pharmacocinétiques seront nécessaires pour évaluer la distribution du peptide bloquant Ninj₂₆₋₃₇ *in vivo* et sa toxicité à long terme en vue d'essais chez l'humain. La génération de peptides plus stables métaboliquement pourrait être aussi envisagée.

Cette présente étude a permis de démontrer que Ninjurin-1 est une nouvelle molécule d'adhérence qui est spécifiquement impliquée dans le recrutement de CPA myéloïdes au sein du SNC (**Schéma 7**) sans affecter celui des lymphocytes T. L'identification et la caractérisation de nouvelles molécules de la BHE humaine contribuera aussi à une meilleure compréhension de la biologie du SNC et mènera éventuellement à la découverte de nouvelles cibles thérapeutiques pour moduler les propriétés de la BHE. Ainsi, Ninjurin-1 constitue une nouvelle cible thérapeutique pour atténuer l'inflammation cérébrale.

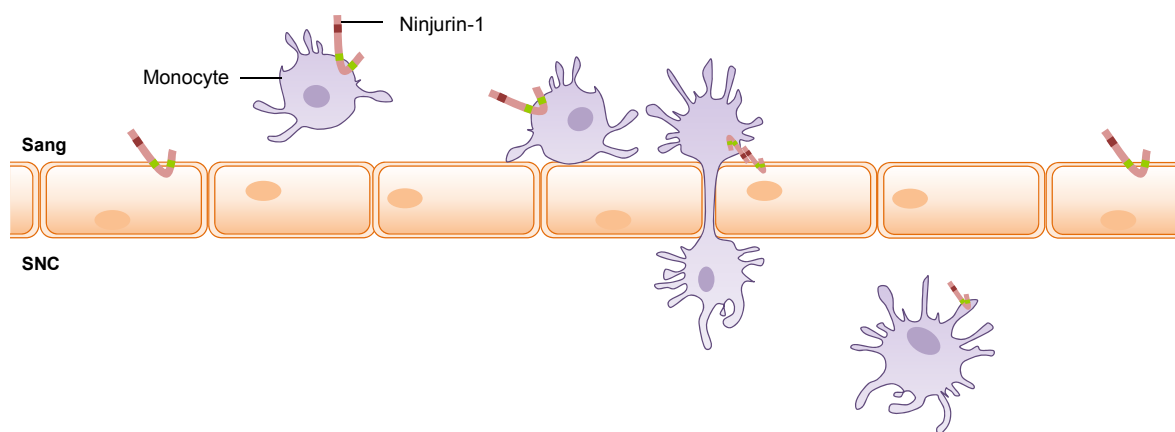


Schéma 7 : Ninjurin-1 est une molécule d'adhérence de la BHE impliquée dans le recrutement des CPA myéloïdes vers le SNC

Ninjurin-1 est une nouvelle molécule d'adhérence qui est exprimée sur l'endothélium vasculaire de la BHE et qui est préférentiellement exprimée sur les CPA myéloïdes. La neutralisation de Ninjurin-1 dans le modèle *in vitro* de la BHE et *in vivo* chez les souris atteintes d'EAE a permis de déterminer que Ninjurin-1 favorise le recrutement des monocytes à travers la BHE. Cette fonction spécifique de Ninjurin-1 fait de cette nouvelle molécule d'adhérence une cible thérapeutique intéressante.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- Abbott,N.J. (2000). Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. *Cell Mol. Neurobiol.* *20*, 131-147.
- Abbott,N.J., Ronnback,L., and Hansson,E. (2006). Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* *7*, 41-53.
- Afonso,P.V., Ozden,S., Prevost,M.C., Schmitt,C., Seilhean,D., Weksler,B., Couraud,P.O., Gessain,A., Romero,I.A., and Ceccaldi,P.E. (2007). Human blood-brain barrier disruption by retroviral-infected lymphocytes: role of myosin light chain kinase in endothelial tight-junction disorganization. *J. Immunol.* *179*, 2576-2583.
- Agger,R., Petersen,M.S., Toldbod,H.E., Holtz,S., Dagnaes-Hansen,F., Johnsen,B.W., Bolund,L., and Hokland,M. (2000). Characterization of murine dendritic cells derived from adherent blood mononuclear cells in vitro. *Scand. J. Immunol.* *52*, 138-147.
- Ahn,B.J., Lee,H.J., Shin,M.W., Choi,J.H., Jeong,J.W., and Kim,K.W. (2009). Ninjurin1 is expressed in myeloid cells and mediates endothelium adhesion in the brains of EAE rats. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *387*, 321-325.
- Aloisi,F. (2001). Immune function of microglia. *Glia* *36*, 165-179.
- Aloisi,F., Ria,F., Penna,G., and Adorini,L. (1998). Microglia are more efficient than astrocytes in antigen processing and in Th1 but not Th2 cell activation. *J. Immunol.* *160*, 4671-4680.
- Ancuta,P., Rao,R., Moses,A., Mehle,A., Shaw,S.K., Luscinskas,F.W., and Gabuzda,D. (2003). Fractalkine preferentially mediates arrest and migration of CD16+ monocytes. *J. Exp. Med.* *197*, 1701-1707.
- Araki,T. and Milbrandt,J. (1996). Ninjurin, a novel adhesion molecule, is induced by nerve injury and promotes axonal growth. *Neuron* *17*, 353-361.
- Araki,T. and Milbrandt,J. (2000). Ninjurin2, a novel homophilic adhesion molecule, is expressed in mature sensory and enteric neurons and promotes neurite outgrowth. *J. Neurosci.* *20*, 187-195.
- Araki,T., Zimonjic,D.B., Popescu,N.C., and Milbrandt,J. (1997). Mechanism of homophilic binding mediated by ninjurin, a novel widely expressed adhesion molecule. *J Biol Chem.* *272*, 21373-21380.
- Ardavin,C., Martinez del,H.G., Martin,P., Anjuere,F., Arias,C.F., Marin,A.R., Ruiz,S., Parrillas,V., and Hernandez,H. (2001). Origin and differentiation of dendritic cells. *Trends Immunol.* *22*, 691-700.
- Argaw,A.T., Zhang,Y., Snyder,B.J., Zhao,M.L., Kopp,N., Lee,S.C., Raine,C.S., Brosnan,C.F., and John,G.R. (2006). IL-1beta regulates blood-brain barrier permeability via reactivation of the hypoxia-angiogenesis program. *J. Immunol.* *177*, 5574-5584.
- Arjmandi,A., Liu,K., and Dorovini-Zis,K. (2009). Dendritic cell adhesion to cerebral endothelium: role of endothelial cell adhesion molecules and their ligands. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *68*, 300-313.

- Auffray,C., Sieweke,M.H., and Geissmann,F. (2009). Blood monocytes: development, heterogeneity, and relationship with dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* *27*, 669-692.
- Bailey,S.L., Schreiner,B., McMahon,E.J., and Miller,S.D. (2007). CNS myeloid DCs presenting endogenous myelin peptides 'preferentially' polarize CD4+ T(H)-17 cells in relapsing EAE. *Nat. Immunol.* *8*, 172-180.
- Bailey-Bucktrout,S.L., Caulkins,S.C., Goings,G., Fischer,J.A., Dzionek,A., and Miller,S.D. (2008). Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* *180*, 6457-6461.
- Barcellos,L.F., Sawcer,S., Ramsay,P.P., Baranzini,S.E., Thomson,G., Briggs,F., Cree,B.C., Begovich,A.B., Villoslada,P., Montalban,X., Uccelli,A., Savettieri,G., Lincoln,R.R., DeLoa,C., Haines,J.L., Pericak-Vance,M.A., Compston,A., Hauser,S.L., and Oksenberg,J.R. (2006). Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* *15*, 2813-2824.
- Baxter,A.G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Rev. Immunol.* *7*, 904-912.
- Bazzoni,G. and Dejana,E. (2004). Endothelial cell-to-cell junctions: molecular organization and role in vascular homeostasis. *Physiol Rev* *84*, 869-901.
- Becher,B. and Antel,J.P. (1996). Comparison of phenotypic and functional properties of immediately ex vivo and cultured human adult microglia. *Glia* *18*, 1-10.
- Becher,B., Bechmann,I., and Greter,M. (2006). Antigen presentation in autoimmunity and CNS inflammation: how T lymphocytes recognize the brain. *J. Mol. Med.* *84*, 532-543.
- Becher,B., Durell,B.G., and Noelle,R.J. (2002). Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest* *110*, 493-497.
- Bechmann,I., Galea,I., and Perry,V.H. (2007). What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* *28*, 5-11.
- Behzadian,M.A., Wang,X.L., Jiang,B., and Caldwell,R.B. (1995). Angiostatic role of astrocytes: suppression of vascular endothelial cell growth by TGF-beta and other inhibitory factor(s). *Glia* *15*, 480-490.
- Bennett,J.L. and Stuve,O. (2009). Update on inflammation, neurodegeneration, and immunoregulation in multiple sclerosis: therapeutic implications. *Clin. Neuropharmacol.* *32*, 121-132.
- Berman,J.W., Guida,M.P., Warren,J., Amat,J., and Brosnan,C.F. (1996). Localization of monocyte chemoattractant peptide-1 expression in the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis and trauma in the rat. *J. Immunol.* *156*, 3017-3023.
- Bettelli,E., Carrier,Y., Gao,W., Korn,T., Strom,T.B., Oukka,M., Weiner,H.L., and Kuchroo,V.K. (2006). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* *441*, 235-238.

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

Bo,L., Mork,S., Kong,P.A., Nyland,H., Pardo,C.A., and Trapp,B.D. (1994). Detection of MHC class II-antigens on macrophages and microglia, but not on astrocytes and endothelia in active multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* *51*, 135-146.

Bo,L., Peterson,J.W., Mork,S., Hoffman,P.A., Gallatin,W.M., Ransohoff,R.M., and Trapp,B.D. (1996). Distribution of immunoglobulin superfamily members ICAM-1, -2, -3, and the beta 2 integrin LFA-1 in multiple sclerosis lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *55*, 1060-1072.

Bruck,W., Porada,P., Poser,S., Rieckmann,P., Hanefeld,F., Kretzschmar,H.A., and Lassmann,H. (1995). Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Ann. Neurol.* *38*, 788-796.

Butcher,E.C. (1991). Leukocyte-endothelial cell recognition: three (or more) steps to specificity and diversity. *Cell* *67*, 1033-1036.

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

Carman,C.V. and Springer,T.A. (2004). A transigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol* *167*, 377-388.

Carmody,R.J., Hilliard,B., Maguschak,K., Chodosh,L.A., and Chen,Y.H. (2002). Genomic scale profiling of autoimmune inflammation in the central nervous system: the nervous response to inflammation. *J. Neuroimmunol.* *133*, 95-107.

Cayrol,R., Wosik,K., Berard,J.L., Dodelet-Devillers,A., Ifergan,I., Kebir,H., Haqqani,A.S., kreymborg,K., Krug,S., Moumdjian,R., Bouthillier,A., Becher,B., Arbour,N., David,S., Stanimirovic,D., and Prat,A. (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat. Immunol.* *9*, 137-145.

Cella,M., Scheidegger,D., Palmer-Lehmann,K., Lane,P., Lanzavecchia,A., and Alber,G. (1996). Ligation of CD40 on dendritic cells triggers production of high levels of interleukin-12 and enhances T cell stimulatory capacity: T-T help via APC activation. *J. Exp. Med.* *184*, 747-752.

Chadwick,B.P., Heath,S.K., Williamson,J., Obermayr,F., Patel,L., Sheer,D., and Frischauf,A.M. (1998). The human homologue of the ninjurin gene maps to the candidate region of hereditary sensory neuropathy type I (HSNI). *Genomics* *47*, 58-63.

Chan,S.H., Perussia,B., Gupta,J.W., Kobayashi,M., Pospisil,M., Young,H.A., Wolf,S.F., Young,D., Clark,S.C., and Trinchieri,G. (1991). Induction of interferon gamma production by natural killer cell stimulatory factor: characterization of the responder cells and synergy with other inducers. *J. Exp. Med.* *173*, 869-879.

Chavarria,A. and Alcocer-Varela,J. (2004). Is damage in central nervous system due to inflammation? *Autoimmun. Rev.* *3*, 251-260.

- Chen,J.S., Coustan-Smith,E., Suzuki,T., Neale,G.A., Mihara,K., Pui,C.H., and Campana,D. (2001). Identification of novel markers for monitoring minimal residual disease in acute lymphoblastic leukemia. *Blood* 97, 2115-2120.
- Chu,C.Q., Wittmer,S., and Dalton,D.K. (2000). Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 192, 123-128.
- Clifford,D.B., DeLuca,A., Simpson,D.M., Arendt,G., Giovannoni,G., and Nath,A. (2010). Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet Neurol.* 9, 438-446.
- Colognato,H. and Yurchenco,P.D. (2000). Form and function: the laminin family of heterotrimers. *Dev. Dyn.* 218, 213-234.
- Cua,D.J., Sherlock,J., Chen,Y., Murphy,C.A., Joyce,B., Seymour,B., Lucian,L., To,W., Kwan,S., Churakova,T., Zurawski,S., Wiekowski,M., Lira,S.A., Gorman,D., Kastelein,R.A., and Sedgwick,J.D. (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.
- D'Andrea,A., Rengaraju,M., Valiante,N.M., Chehimi,J., Kubin,M., Aste,M., Chan,S.H., Kobayashi,M., Young,D., Nickbarg,E., and . (1992). Production of natural killer cell stimulatory factor (interleukin 12) by peripheral blood mononuclear cells. *J. Exp. Med.* 176, 1387-1398.
- Dalton,D.K., Pitts-Meek,S., Keshav,S., Figari,I.S., Bradley,A., and Stewart,T.A. (1993). Multiple defects of immune cell function in mice with disrupted interferon-gamma genes. *Science* 259, 1739-1742.
- Dang,L.H., Michalek,M.T., Takei,F., Benaceraff,B., and Rock,K.L. (1990). Role of ICAM-1 in antigen presentation demonstrated by ICAM-1 defective mutants. *J. Immunol.* 144, 4082-4091.
- de Vos,A.F., van Meurs,M., Brok,H.P., Boven,L.A., Hintzen,R.Q., van,d., V, Ravid,R., Rensing,S., Boon,L., 't Hart,B.A., and Laman,J.D. (2002). Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol.* 169, 5415-5423.
- Dejana,E., Orsenigo,F., and Lampugnani,M.G. (2008). The role of adherens junctions and VE-cadherin in the control of vascular permeability. *J Cell Sci* 121, 2115-2122.
- Dimitrijevic,O.B., Stamatovic,S.M., Keep,R.F., and Andjelkovic,A.V. (2006). Effects of the chemokine CCL2 on blood-brain barrier permeability during ischemia-reperfusion injury. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 26, 797-810.
- Dodelet-Devillers,A., Cayrol,R., van,H.J., Haqqani,A.S., de Vries,H.E., Engelhardt,B., Greenwood,J., and Prat,A. (2009). Functions of lipid raft membrane microdomains at the blood-brain barrier. *J. Mol. Med.* 87, 765-774.
- Dustin,M.L. and Springer,T.A. (1991). Role of lymphocyte adhesion receptors in transient interactions and cell locomotion. *Annu. Rev. Immunol.* 9, 27-66.

- Emerson, M.R., Gallagher, R.J., Marquis, J.G., and LeVine, S.M. (2009). Enhancing the ability of experimental autoimmune encephalomyelitis to serve as a more rigorous model of multiple sclerosis through refinement of the experimental design. *Comp Med.* *59*, 112-128.
- Engelhardt, B. (2006). Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm.* *113*, 477-485.
- Engelhardt, B. and Ransohoff, R.M. (2005). The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* *26*, 485-495.
- Engelhardt, B. and Sorokin, L. (2009). The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction. *Semin. Immunopathol.* *31*, 497-511.
- Engelhardt, B., Vestweber, D., Hallmann, R., and Schulz, M. (1997). E- and P-selectin are not involved in the recruitment of inflammatory cells across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Blood* *90*, 4459-4472.
- Ferber, I.A., Brocke, S., Taylor-Edwards, C., Ridgway, W., Dinisco, C., Steinman, L., Dalton, D., and Fathman, C.G. (1996). Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol.* *156*, 5-7.
- Fife, B.T., Huffnagle, G.B., Kuziel, W.A., and Karpus, W.J. (2000). CC chemokine receptor 2 is critical for induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* *192*, 899-905.
- Flavin, M.P., Coughlin, K., and Ho, L.T. (1997). Soluble macrophage factors trigger apoptosis in cultured hippocampal neurons. *Neuroscience* *80*, 437-448.
- Flugel, A., Berkowicz, T., Ritter, T., Labeur, M., Jenne, D.E., Li, Z., Ellwart, J.W., Willem, M., Lassmann, H., and Wekerle, H. (2001). Migratory activity and functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunity.* *14*, 547-560.
- Forster, C., Burek, M., Romero, I.A., Weksler, B., Couraud, P.O., and Drenckhahn, D. (2008). Differential effects of hydrocortisone and TNFalpha on tight junction proteins in an in vitro model of the human blood-brain barrier. *J. Physiol* *586*, 1937-1949.
- Friese, M.A. and Fugger, L. (2005). Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* *128*, 1747-1763.
- Fuentes, M.E., Durham, S.K., Swerdel, M.R., Lewin, A.C., Barton, D.S., Megill, J.R., Bravo, R., and Lira, S.A. (1995). Controlled recruitment of monocytes and macrophages to specific organs through transgenic expression of monocyte chemoattractant protein-1. *J. Immunol.* *155*, 5769-5776.
- Geissmann, F., Jung, S., and Littman, D.R. (2003). Blood monocytes consist of two principal subsets with distinct migratory properties. *Immunity* *19*, 71-82.
- Geissmann, F., Manz, M.G., Jung, S., Sieweke, M.H., Merad, M., and Ley, K. (2010). Development of monocytes, macrophages, and dendritic cells. *Science* *327*, 656-661.
- Gloor, S.M., Weber, A., Adachi, N., and Frei, K. (1997). Interleukin-1 modulates protein tyrosine phosphatase activity and permeability of brain endothelial cells. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* *239*, 804-809.

- Gold,R., Linington,C., and Lassmann,H. (2006). Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* 129, 1953-1971.
- Gran,B., Zhang,G.X., Yu,S., Li,J., Chen,X.H., Ventura,E.S., Kamoun,M., and Rostami,A. (2002). IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J. Immunol.* 169, 7104-7110.
- Greter,M., Heppner,F.L., Lemos,M.P., Odermatt,B.M., Goebels,N., Laufer,T., Noelle,R.J., and Becher,B. (2005). Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat. Med.* 11, 328-334.
- Guermonprez,P., Valladeau,J., Zitvogel,L., Thery,C., and Amigorena,S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu. Rev. Immunol.* 20, 621-667.
- Hamilton,J.A. (2002). GM-CSF in inflammation and autoimmunity. *Trends Immunol.* 23, 403-408.
- Harding,C.V., Ramachandra,L., and Wick,M.J. (2003). Interaction of bacteria with antigen presenting cells: influences on antigen presentation and antibacterial immunity. *Curr. Opin. Immunol.* 15, 112-119.
- Harding,F.A., McArthur,J.G., Gross,J.A., Raulet,D.H., and Allison,J.P. (1992). CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones. *Nature* 356, 607-609.
- Harhaj,N.S. and Antonetti,D.A. (2004). Regulation of tight junctions and loss of barrier function in pathophysiology. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 36, 1206-1237.
- Hart,M.N. and Fabry,Z. (1995). CNS antigen presentation. *Trends Neurosci.* 18, 475-481.
- Hathcock,K.S., Laszlo,G., Pucillo,C., Linsley,P., and Hodes,R.J. (1994). Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function. *J. Exp. Med.* 180, 631-640.
- Hawkins,B.T. and Davis,T.P. (2005). The blood-brain barrier/neurovascular unit in health and disease. *Pharmacol. Rev.* 57, 173-185.
- Hendriks,J.J., Teunissen,C.E., de Vries,H.E., and Dijkstra,C.D. (2005). Macrophages and neurodegeneration. *Brain Res. Brain Res. Rev.* 48, 185-195.
- Hickey,W.F., Hsu,B.L., and Kimura,H. (1991). T-lymphocyte entry into the central nervous system. *J. Neurosci. Res.* 28, 254-260.
- Huber,J.D., Witt,K.A., Hom,S., Egleton,R.D., Mark,K.S., and Davis,T.P. (2001). Inflammatory pain alters blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am. J. Physiol Heart Circ. Physiol* 280, H1241-H1248.
- Huitinga,I., Ruuls,S.R., Jung,S., van,R.N., Hartung,H.P., and Dijkstra,C.D. (1995). Macrophages in T cell line-mediated, demyelinating, and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats. *Clin. Exp. Immunol.* 100, 344-351.

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

Igarashi,Y., Utsumi,H., Chiba,H., Yamada-Sasamori,Y., Tobioka,H., Kamimura,Y., Furuuchi,K., Kokai,Y., Nakagawa,T., Mori,M., and Sawada,N. (1999). Glial cell line-derived neurotrophic factor induces barrier function of endothelial cells forming the blood-brain barrier. *Biochem. Biophys. Res Commun.* *261*, 108-112.

Issazadeh,S., Mustafa,M., Ljungdahl,A., Hojeborg,B., Dagerlind,A., Elde,R., and Olsson,T. (1995). Interferon gamma, interleukin 4 and transforming growth factor beta in experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats: dynamics of cellular mRNA expression in the central nervous system and lymphoid cells. *J. Neurosci. Res.* *40*, 579-590.

Izikson,L., Klein,R.S., Luster,A.D., and Weiner,H.L. (2002). Targeting monocyte recruitment in CNS autoimmune disease. *Clin. Immunol.* *103*, 125-131.

Jager,A., Dardalhon,V., Sobel,R.A., Bettelli,E., and Kuchroo,V.K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J. Immunol.* *183*, 7169-7177.

Jarrossay,D., Napolitani,G., Colonna,M., Sallusto,F., and Lanzavecchia,A. (2001). Specialization and complementarity in microbial molecule recognition by human myeloid and plasmacytoid dendritic cells. *Eur. J. Immunol.* *31*, 3388-3393.

Jerregard,H. (2001). Sensory neurons influence the expression of cell adhesion factors by cutaneous cells in vitro and in vivo. *J. Neurocytol.* *30*, 327-336.

Jersild,C., Fog,T., Hansen,G.S., Thomsen,M., Svejgaard,A., and Dupont,B. (1973). Histocompatibility determinants in multiple sclerosis, with special reference to clinical course. *Lancet* *2*, 1221-1225.

Karman,J., Ling,C., Sandor,M., and Fabry,Z. (2004). Dendritic cells in the initiation of immune responses against central nervous system-derived antigens. *Immunol. Lett.* *92*, 107-115.

Karpus,W.J. and Kennedy,K.J. (1997). MIP-1alpha and MCP-1 differentially regulate acute and relapsing autoimmune encephalomyelitis as well as Th1/Th2 lymphocyte differentiation. *J. Leukoc. Biol.* *62*, 681-687.

Kaufmann,S.H. (2007). The contribution of immunology to the rational design of novel antibacterial vaccines. *Nat. Rev. Microbiol.* *5*, 491-504.

Kebir,H., kreymborg,K., Ifergan,I., Dodelet-Devillers,A., Giuliani,F., Arbour,N., Becher,B., and Prat,A. (2007). Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat. Med.* **10.1038/nm1651**.

Kennedy,K.J., Strieter,R.M., Kunkel,S.L., Lukacs,N.W., and Karpus,W.J. (1998). Acute and relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis are regulated by differential expression of the CC chemokines macrophage inflammatory protein-1alpha and monocyte chemoattractant protein-1. *J. Neuroimmunol.* *92*, 98-108.

- Kim,J.W., Moon,A.R., Kim,J.H., Yoon,S.Y., Oh,G.T., Choe,Y.K., and Choe,I.S. (2001). Up-Regulation of ninjurin expression in human hepatocellular carcinoma associated with cirrhosis and chronic viral hepatitis. *Mol. Cells* *11*, 151-157.
- King,I.L., Dickendeshier,T.L., and Segal,B.M. (2009). Circulating Ly-6C+ myeloid precursors migrate to the CNS and play a pathogenic role during autoimmune demyelinating disease. *Blood* *113*, 3190-3197.
- Korn,T. (2008). Pathophysiology of multiple sclerosis. *J. Neurol.* *255 Suppl 6*, 2-6.
- Kouwenhoven,M., Teleshova,N., Ozenci,V., Press,R., and Link,H. (2001). Monocytes in multiple sclerosis: phenotype and cytokine profile. *J. Neuroimmunol.* *112*, 197-205.
- Krasowska-Zoladek,A., Banaszewska,M., Kraszpulski,M., and Konat,G.W. (2007). Kinetics of inflammatory response of astrocytes induced by TLR 3 and TLR4 ligation. *J. Neurosci. Res.* *85*, 205-212.
- Kroenke,M.A., Chensue,S.W., and Segal,B.M. (2010). EAE mediated by a non-IFN-gamma/non-IL-17 pathway. *Eur. J. Immunol.*
- Lacruz,S., Isler,P., Vey,E., Welgus,H.G., and Dayer,J.M. (1994). Direct contact between T lymphocytes and monocytes is a major pathway for induction of metalloproteinase expression. *J. Biol. Chem.* *269*, 22027-22033.
- Lambert,C., Desbarats,J., Arbour,N., Hall,J.A., Olivier,A., Bar-Or,A., and Antel,J.P. (2008). Dendritic cell differentiation signals induce anti-inflammatory properties in human adult microglia. *J. Immunol.* *181*, 8288-8297.
- Lassmann,H., Bruck,W., and Lucchinetti,C. (2001). Heterogeneity of multiple sclerosis pathogenesis: implications for diagnosis and therapy. *Trends Mol. Med.* *7*, 115-121.
- Leon,B. and Ardavin,C. (2008). Monocyte-derived dendritic cells in innate and adaptive immunity. *Immunol. Cell Biol.* *86*, 320-324.
- Leon,B., Lopez-Bravo,M., and Ardavin,C. (2005). Monocyte-derived dendritic cells. *Semin. Immunol.* *17*, 313-318.
- Leon,B., Martinez del,H.G., Parrillas,V., Vargas,H.H., Sanchez-Mateos,P., Longo,N., Lopez-Bravo,M., and Ardavin,C. (2004). Dendritic cell differentiation potential of mouse monocytes: monocytes represent immediate precursors of CD8- and CD8+ splenic dendritic cells. *Blood* *103*, 2668-2676.
- Ley,K., Laudanna,C., Cybulsky,M.I., and Nourshargh,S. (2007). Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated. *Nat. Rev Immunol.* *7*, 678-689.
- Linker,R.A., Rott,E., Hofstetter,H.H., Hanke,T., Toyka,K.V., and Gold,R. (2005). EAE in beta-2 microglobulin-deficient mice: axonal damage is not dependent on MHC-I restricted immune responses. *Neurobiol. Dis.* *19*, 218-228.
- Lopez,C., Comabella,M., Al-Zayat,H., Tintore,M., and Montalban,X. (2006). Altered maturation of circulating dendritic cells in primary progressive MS patients. *J. Neuroimmunol.* *175*, 183-191.

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

Macatonia,S.E., Hosken,N.A., Litton,M., Vieira,P., Hsieh,C.S., Culpepper,J.A., Wysocka,M., Trinchieri,G., Murphy,K.M., and O'Garra,A. (1995). Dendritic cells produce IL-12 and direct the development of Th1 cells from naive CD4+ T cells. *J Immunol.* *154*, 5071-5079.

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

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

Mark,K.S. and Miller,D.W. (1999). Increased permeability of primary cultured brain microvessel endothelial cell monolayers following TNF-alpha exposure. *Life Sci.* *64*, 1941-1953.

Martin-Padura,I., Lostaglio,S., Schneemann,M., Williams,L., Romano,M., Fruscella,P., Panzeri,C., Stoppacciaro,A., Ruco,L., Villa,A., Simmons,D., and Dejana,E. (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J. Cell Biol.* *142*, 117-127.

Matsuda,H., Suda,T., Hashizume,H., Yokomura,K., Asada,K., Suzuki,K., Chida,K., and Nakamura,H. (2002). Alteration of balance between myeloid dendritic cells and plasmacytoid dendritic cells in peripheral blood of patients with asthma. *Am. J. Respir. Crit Care Med.* *166*, 1050-1054.

McCaffrey,G., Staatz,W.D., Quigley,C.A., Nametz,N., Seelbach,M.J., Campos,C.R., Brooks,T.A., Egleton,R.D., and Davis,T.P. (2007). Tight junctions contain oligomeric protein assembly critical for maintaining blood-brain barrier integrity in vivo. *J Neurochem.*

McCandless,E.E. and Klein,R.S. (2007). Molecular targets for disrupting leukocyte trafficking during multiple sclerosis. *Expert. Rev. Mol. Med.* *9*, 1-19.

McEver,R.P. (2002). Selectins: lectins that initiate cell adhesion under flow. *Curr. Opin. Cell Biol.* *14*, 581-586.

McKenzie,B.S., Kastelein,R.A., and Cua,D.J. (2006). Understanding the IL-23-IL-17 immune pathway. *Trends Immunol.* *27*, 17-23.

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

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

Menetrier-Caux,C., Thomachot,M.C., Alberti,L., Montmain,G., and Blay,J.Y. (2001). IL-4 prevents the blockade of dendritic cell differentiation induced by tumor cells. *Cancer Res.* *61*, 3096-3104.

Mildner,A., Schmidt,H., Nitsche,M., Merkler,D., Hanisch,U.K., Mack,M., Heikenwalder,M., Bruck,W., Priller,J., and Prinz,M. (2007). Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nat. Neurosci.* *10*, 1544-1553.

- Miller,S.D., McMahon,E.J., Schreiner,B., and Bailey,S.L. (2007). Antigen presentation in the CNS by myeloid dendritic cells drives progression of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1103*, 179-191.
- Milo,R. and Kahana,E. (2010). Multiple sclerosis: geoeidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun. Rev.* *9*, A387-A394.
- Minagar,A. and Alexander,J.S. (2003). Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis. *Mult. Scler.* *9*, 540-549.
- Muller,W.A. and Randolph,G.J. (1999). Migration of leukocytes across endothelium and beyond: molecules involved in the transmigration and fate of monocytes. *J Leukoc. Biol* *66*, 698-704.
- Nagafuchi,A. (2001). Molecular architecture of adherens junctions. *Curr. Opin. Cell Biol.* *13*, 600-603.
- Nikcevlch,K.M., Gordon,K.B., Tan,L., Hurst,S.D., Kroepfl,J.F., Gardinier,M., Barrett,T.A., and Miller,S.D. (1997). IFN-gamma-activated primary murine astrocytes express B7 costimulatory molecules and prime naive antigen-specific T cells. *J. Immunol.* *158*, 614-621.
- Nitta,T., Hata,M., Gotoh,S., Seo,Y., Sasaki,H., Hashimoto,N., Furuse,M., and Tsukita,S. (2003). Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol* *161*, 653-660.
- Noseworthy,J.H., Lucchinetti,C., Rodriguez,M., and Weinshenker,B.G. (2000). Multiple sclerosis. *N. Engl. J Med.* *343*, 938-952.
- Owens,T., Bechmann,I., and Engelhardt,B. (2008). Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *67*, 1113-1121.
- Paglinawan,R., Malipiero,U., Schlapbach,R., Frei,K., Reith,W., and Fontana,A. (2003). TGFbeta directs gene expression of activated microglia to an anti-inflammatory phenotype strongly focusing on chemokine genes and cell migratory genes. *Glia* *44*, 219-231.
- Palucka,K. and Banchereau,J. (1999). Dendritic cells: a link between innate and adaptive immunity. *J Clin. Immunol.* *19*, 12-25.
- Pashenkov,M., Teleshova,N., Kouwenhoven,M., Kostulas,V., Huang,Y.M., Soderstrom,M., and Link,H. (2002). Elevated expression of CCR5 by myeloid (CD11c+) blood dendritic cells in multiple sclerosis and acute optic neuritis. *Clin. Exp. Immunol.* *127*, 519-526.
- Pashenkov,M., Teleshova,N., and Link,H. (2003). Inflammation in the central nervous system: the role for dendritic cells. *Brain Pathol.* *13*, 23-33.
- Piani,D. and Fontana,A. (1994). Involvement of the cystine transport system xc- in the macrophage-induced glutamate-dependent cytotoxicity to neurons. *J. Immunol.* *152*, 3578-3585.
- Pohl,D. (2009). Epstein-Barr virus and multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* *286*, 62-64.
- Ponomarev,E.D., Shriver,L.P., Maresz,K., Pedras-Vasconcelos,J., Verthelyi,D., and Dittel,B.N. (2007). GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* *178*, 39-48.

- Prat,A., Biernacki,K., Becher,B., and Antel,J.P. (2000). B7 expression and antigen presentation by human brain endothelial cells: requirement for proinflammatory cytokines. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 129-136.
- Prat,A., Biernacki,K., Lavoie,J.F., Poirier,J., Duquette,P., and Antel,J.P. (2002). Migration of multiple sclerosis lymphocytes through brain endothelium. *Arch. Neurol.* 59, 391-397.
- Prat,A., Biernacki,K., Wosik,K., and Antel,J.P. (2001). Glial cell influence on the human blood-brain barrier. *Glia* 36, 145-155.
- Randolph,G.J., Beaulieu,S., Lebecque,S., Steinman,R.M., and Muller,W.A. (1998). Differentiation of monocytes into dendritic cells in a model of transendothelial trafficking. *Science* 282, 480-483.
- Ransohoff,R.M., Kivisakk,P., and Kidd,G. (2003). Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat. Rev. Immunol.* 3, 569-581.
- Reis e Sousa (2006). Dendritic cells in a mature age. *Nat. Rev. Immunol.* 6, 476-483.
- Rezaie,P. and Male,D. (1999). Colonisation of the developing human brain and spinal cord by microglia: a review. *Microsc. Res. Tech.* 45, 359-382.
- Rissoan,M.C., Soumelis,V., Kadowaki,N., Grouard,G., Briere,F., de Waal,M.R., and Liu,Y.J. (1999). Reciprocal control of T helper cell and dendritic cell differentiation. *Science* 283, 1183-1186.
- Rubin,L.L., Hall,D.E., Porter,S., Barbu,K., Cannon,C., Horner,H.C., Janatpour,M., Liaw,C.W., Manning,K., Morales,J., and . (1991). A cell culture model of the blood-brain barrier. *J. Cell Biol.* 115, 1725-1735.
- Rubin,L.L. and Staddon,J.M. (1999). The cell biology of the blood-brain barrier. *Annu. Rev. Neurosci.* 22, 11-28.
- Saikali,P., Antel,J.P., Newcombe,J., Chen,Z., Freedman,M., Blain,M., Cayrol,R., Prat,A., Hall,J.A., and Arbour,N. (2007). NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J. Neurosci.* 27, 1220-1228.
- Sallusto,F. and Lanzavecchia,A. (1994). Efficient presentation of soluble antigen by cultured human dendritic cells is maintained by granulocyte/macrophage colony-stimulating factor plus interleukin 4 and downregulated by tumor necrosis factor alpha. *J. Exp. Med.* 179, 1109-1118.
- Sallusto,F., Schaerli,P., Loetscher,P., Schaniel,C., Lenig,D., Mackay,C.R., Qin,S., and Lanzavecchia,A. (1998). Rapid and coordinated switch in chemokine receptor expression during dendritic cell maturation. *Eur. J. Immunol.* 28, 2760-2769.
- Sasaki,N., Higashi,N., Taka,T., Nakajima,M., and Irimura,T. (2004). Cell surface localization of heparanase on macrophages regulates degradation of extracellular matrix heparan sulfate. *J. Immunol.* 172, 3830-3835.
- Saxena,A., Bauer,J., Scheikl,T., Zappulla,J., Audebert,M., Desbois,S., Waisman,A., Lassmann,H., Liblau,R.S., and Mars,L.T. (2008). Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J. Immunol.* 181, 1617-1621.

- Schulz,M. and Engelhardt,B. (2005). The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal. Fluid Res* 2, 8.
- Seguin,R., Biernacki,K., Rotondo,R.L., Prat,A., and Antel,J.P. (2003a). Regulation and functional effects of monocyte migration across human brain-derived endothelial cells. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 62, 412-419.
- Seguin,R., Moditi,Z., Rotondo,R., Biernacki,K., Wosik,K., Prat,A., and Antel,J.P. (2003b). Human brain endothelial cells supply support for monocyte immunoregulatory functions. *J Neuroimmunol.* 135, 96-106.
- Serafini,B., Columba-Cabezas,S., Di Rosa,F., and Aloisi,F. (2000). Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Am. J Pathol.* 157, 1991-2002.
- Serafini,B., Rosicarelli,B., Magliozzi,R., Stigliano,E., Capello,E., Mancardi,G.L., and Aloisi,F. (2006). Dendritic cells in multiple sclerosis lesions: maturation stage, myelin uptake, and interaction with proliferating T cells. *J Neuropathol. Exp. Neurol.* 65, 124-141.
- Seta,N. and Kuwana,M. (2007). Human circulating monocytes as multipotential progenitors. *Keio J. Med.* 56, 41-47.
- Siddharthan,V., Kim,Y.V., Liu,S., and Kim,K.S. (2007). Human astrocytes/astrocyte-conditioned medium and shear stress enhance the barrier properties of human brain microvascular endothelial cells. *Brain Res* 1147, 39-50.
- Silwedel,C. and Forster,C. (2006). Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli. *J. Neuroimmunol.* 179, 37-45.
- Simpson,J.E., Newcombe,J., Cuzner,M.L., and Woodrooffe,M.N. (1998). Expression of monocyte chemoattractant protein-1 and other beta- chemokines by resident glia and inflammatory cells in multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 84, 238-249.
- Singer,S.J. (1990). The structure and insertion of integral proteins in membranes. *Annu. Rev. Cell Biol.* 6, 247-296.
- Sonobe,Y., Takeuchi,H., Kataoka,K., Li,H., Jin,S., Mimuro,M., Hashizume,Y., Sano,Y., Kanda,T., Mizuno,T., and Suzumura,A. (2009). Interleukin-25 expressed by brain capillary endothelial cells maintains blood-brain barrier function in a protein kinase Cepsilon-dependent manner. *J. Biol. Chem.* 284, 31834-31842.
- Sozzani,S., Allavena,P., D'Amico,G., Luini,W., Bianchi,G., Kataura,M., Imai,T., Yoshie,O., Bonecchi,R., and Mantovani,A. (1998). Differential regulation of chemokine receptors during dendritic cell maturation: a model for their trafficking properties. *J. Immunol.* 161, 1083-1086.
- Stamatovic,S.M., Keep,R.F., and Andjelkovic,A.V. (2008). Brain endothelial cell-cell junctions: how to "open" the blood brain barrier. *Curr. Neuropharmacol.* 6, 179-192.

Stamatovic,S.M., Shakui,P., Keep,R.F., Moore,B.B., Kunkel,S.L., van,R.N., and Andjelkovic,A.V. (2005). Monocyte chemoattractant protein-1 regulation of blood-brain barrier permeability. *J. Cereb. Blood Flow Metab* 25, 593-606.

Steffen,B.J., Butcher,E.C., and Engelhardt,B. (1994). Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse. *Am. J. Pathol.* 145, 189-201.

Streit,W.J. and Graeber,M.B. (1993). Heterogeneity of microglial and perivascular cell populations: insights gained from the facial nucleus paradigm. *Glia* 7, 68-74.

Stuve,O., Youssef,S., Slavin,A.J., King,C.L., Patarroyo,J.C., Hirschberg,D.L., Brickey,W.J., Soos,J.M., Piskurich,J.F., Chapman,H.A., and Zamvil,S.S. (2002). The role of the MHC class II transactivator in class II expression and antigen presentation by astrocytes and in susceptibility to central nervous system autoimmune disease. *J. Immunol.* 169, 6720-6732.

Swirski,F.K., Nahrendorf,M., Etzrodt,M., Wildgruber,M., Cortez-Retamozo,V., Panizzi,P., Figueiredo,J.L., Kohler,R.H., Chudnovskiy,A., Waterman,P., Aikawa,E., Mempel,T.R., Libby,P., Weissleder,R., and Pittet,M.J. (2009). Identification of splenic reservoir monocytes and their deployment to inflammatory sites. *Science* 325, 612-616.

Toyama,T., Sasaki,Y., Horimoto,M., Iyoda,K., Yakushijin,T., Ohkawa,K., Takehara,T., Kasahara,A., Araki,T., Hori,M., and Hayashi,N. (2004). Ninjurin1 increases p21 expression and induces cellular senescence in human hepatoma cells. *J. Hepatol.* 41, 637-643.

Tran,E.H., Hoekstra,K., van Rooijen,N., Dijkstra,C.D., and Owens,T. (1998). 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.* 161, 3767-3775.

Tran,N.D., Correale,J., Schreiber,S.S., and Fisher,M. (1999). Transforming growth factor-beta mediates astrocyte-specific regulation of brain endothelial anticoagulant factors. *Stroke* 30, 1671-1678.

Trapp,B.D., Peterson,J., Ransohoff,R.M., Rudick,R., Mork,S., and Bo,L. (1998). Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 338, 278-285.

Ueno,M. (2007). Molecular anatomy of the brain endothelial barrier: an overview of the distributional features. *Curr. Med. Chem.* 14, 1199-1206.

Ulvestad,E., Williams,K., Bo,L., Trapp,B., Antel,J., and Mork,S. (1994). HLA class II molecules (HLA-DR, -DP, -DQ) on cells in the human CNS studied in situ and in vitro. *Immunology* 82, 535-541.

Utsumi,H., Chiba,H., Kamimura,Y., Osanai,M., Igarashi,Y., Tobioka,H., Mori,M., and Sawada,N. (2000). Expression of GFRalpha-1, receptor for GDNF, in rat brain capillary during postnatal development of the BBB. *Am. J. Physiol Cell Physiol* 279, C361-C368.

Van Der Voorn,P., Tekstra,J., Beelen,R.H., Tensen,C.P., van,d., V, and De Groot,C.J. (1999). Expression of MCP-1 by reactive astrocytes in demyelinating multiple sclerosis lesions. *Am. J. Pathol.* 154, 45-51.

- van Horssen,J., Bo,L., Dijkstra,C.D., and de Vries,H.E. (2006). Extensive extracellular matrix depositions in active multiple sclerosis lesions. *Neurobiol. Dis.* 24, 484-491.
- van Horssen,J., Dijkstra,C.D., and de Vries,H.E. (2007). The extracellular matrix in multiple sclerosis pathology. *J Neurochem.* 103, 1293-1301.
- van,d., V and De Groot,C.J. (2000). Staging of multiple sclerosis (MS) lesions: pathology of the time frame of MS. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 26, 2-10.
- Vecchi,A., Massimiliano,L., Ramponi,S., Luini,W., Bernasconi,S., Bonocchi,R., Allavena,P., Parmentier,M., Mantovani,A., and Sozzani,S. (1999). Differential responsiveness to constitutive vs. inducible chemokines of immature and mature mouse dendritic cells. *J. Leukoc. Biol.* 66, 489-494.
- Veldhoen,M. and Stockinger,B. (2006). TGFbeta1, a "Jack of all trades": the link with pro-inflammatory IL-17-producing T cells. *Trends Immunol.* 27, 358-361.
- Vos,C.M., van Haastert,E.S., De Groot,C.J., van,d., V, and de Vries,H.E. (2003). Matrix metalloproteinase-12 is expressed in phagocytotic macrophages in active multiple sclerosis lesions. *J. Neuroimmunol.* 138, 106-114.
- Washington,R., Burton,J., Todd,R.F., III, Newman,W., Dragovic,L., and Dore-Duffy,P. (1994). Expression of immunologically relevant endothelial cell activation antigens on isolated central nervous system microvessels from patients with multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 35, 89-97.
- Wekerle,H., Sun,D., Oropeza-Wekerle,R.L., and Meyermann,R. (1987). Immune reactivity in the nervous system: modulation of T-lymphocyte activation by glial cells. *J. Exp. Biol.* 132, 43-57.
- Willenborg,D.O., Fordham,S.A., Staykova,M.A., Ramshaw,I.A., and Cowden,W.B. (1999). IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide. *J. Immunol.* 163, 5278-5286.
- Wolburg,H. and Lippoldt,A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul. Pharmacol.* 38, 323-337.
- Wong,D. and Dorovini-Zis,K. (1992). Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol.* 39, 11-21.
- Wong,D. and Dorovini-Zis,K. (1995). Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *Microvasc. Res.* 49, 325-339.
- Wong,D. and Dorovini-Zis,K. (1996). Platelet/endothelial cell adhesion molecule-1 (PECAM-1) expression by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *Brain Res.* 731, 217-220.
- Wong,D., Prameya,R., and Dorovini-Zis,K. (2007). Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability. *J. Neuroimmunol.* 184, 136-148.

- Wosik,K., Cayrol,R., Dodelet-Devillers,A., Berthelet,F., Bernard,M., Moumdjian,R., Bouthillier,A., Reudelhuber,T.L., and Prat,A. (2007). Angiotensin II Controls Occludin Function and Is Required for Blood Brain Barrier Maintenance: Relevance to Multiple Sclerosis. *J Neurosci.* *27*, 9032-9042.
- Wu,G.F. and Laufer,T.M. (2007). The role of dendritic cells in multiple sclerosis. *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* *7*, 245-252.
- Wu,L. and Liu,Y.J. (2007). Development of dendritic-cell lineages. *Immunity.* *26*, 741-750.
- Yang,L., Anderson,D.E., Baecher-Allan,C., Hastings,W.D., Bettelli,E., Oukka,M., Kuchroo,V.K., and Hafler,D.A. (2008). IL-21 and TGF-beta are required for differentiation of human T(H)17 cells. *Nature* *454*, 350-352.
- Yeh,E.A., Chitnis,T., Krupp,L., Ness,J., Chabas,D., Kuntz,N., and Waubant,E. (2009). Pediatric multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* *5*, 621-631.
- Yurchenco,P.D. and Schittny,J.C. (1990). Molecular architecture of basement membranes. *FASEB J.* *4*, 1577-1590.
- Zhang,S., Dailey,G.M., Kwan,E., Glasheen,B.M., Sroga,G.E., and Page-McCaw,A. (2006). An MMP liberates the Ninjurin A ectodomain to signal a loss of cell adhesion. *Genes Dev.* *20*, 1899-1910.
- Zhong,Z., Deane,R., Ali,Z., Parisi,M., Shapovalov,Y., O'Banion,M.K., Stojanovic,K., Sagare,A., Boillee,S., Cleveland,D.W., and Zlokovic,B.V. (2008). ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration. *Nat. Neurosci.* *11*, 420-422.
- Zlokovic,B.V. (2008). The blood-brain barrier in health and chronic neurodegenerative disorders. *Neuron* *57*, 178-201.