

Thèse de Doctorat

Flora GUILLOT

*Mémoire présenté en vue de l'obtention du
grade de Docteur de l'Université de Nantes
sous le label de L'Université Nantes Angers Le Mans*

École doctorale : *Biologie-Santé*

Discipline : *Sciences de la vie et de la santé*

Spécialité : *Neuro-Immunologie*

Unité de recherche : *INSERM U1064*

Soutenue le *31 Octobre 2014*

Thèse N° :

Caractérisation de l'infiltrat lymphocytaire et de la réactivité astrocytaire dans un modèle de neuroinflammation autoimmune

JURY

Rapporteurs : **José Boucraut**, MCU, HC-PH, Université d'Aix- Marseille

Serge Nataf, PU-PH, Université de Lyon 1

Examineur : **David-Axel LAPLAUD**, PU-PH, Université de Nantes

Directeur de Thèse : **Arnaud NICOT**, CR1 Inserm, Université de Nantes

REMERCIEMENTS

Cette thèse symbolise l'aboutissement d'un accomplissement personnel. Elle a été remplie de partages, d'apprentissages et d'amitiés enrichissantes tant professionnellement que personnellement. Ces quelques lignes sont l'occasion pour moi de remercier sincèrement ceux qui ont contribué à cette expérience.

J'adresse mes premiers remerciements à Messieurs José Boucraut et Serge Nataf. Je suis très honorée que vous ayez accepté d'être membres de mon jury ainsi que d'évaluer mon travail en étant les rapporteurs de ma thèse.

J'adresse également mes remerciements à Ignacio Anegon pour m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

Je remercie la région Pays de la Loire d'avoir financé mon projet de thèse ainsi que l'école Doctorale Biologie-Santé de Nantes pour sa participation dans le financement de mon voyage à Porto pour le « 13th ESNI course ».

Merci à mon directeur de thèse, Arnaud Nicot, pour avoir accepté d'encadrer cette thèse et de m'avoir ainsi donné l'opportunité de vivre cette aventure inédite et inoubliable.

Je tiens également à adresser mes plus bienveillants remerciements à David Laplaud et Sophie Brouard pour leur accueil chaleureux au sein de l'équipe. Merci à vous deux, pour le regard scientifique que vous avez porté sur mon travail. Merci à toi, David, de m'avoir fait vivre ton quotidien auprès de tes patients, de m'avoir permis d'assister à différents congrès internationaux. J'apprécie ton implication sans faille au quotidien ainsi que de ton investissement professionnel dans la recherche sur la SEP.



La rédaction de ce mémoire m'a montrée une fois de plus que la thèse est loin d'être un travail solitaire et les résultats obtenus n'existeraient pas sans le soutien d'un grand nombre de personnes :

- Tout d'abord, Arnaud, qui en plus d'avoir été mon directeur, m'a aussi appris les bases de l'EAE et de l'immunohistochimie...

- L'équipe SEP avec Alex, le pilier de l'équipe toujours partante pour de nouvelles aventures; Laure et Annie, même si vous ne faites plus partie physiquement de l'équipe, j'ai passé de bons moments avec vous et merci à toi Annie d'être toujours restée la même ; Marion toujours de bons conseils ; Bryan toujours au service de ces dames... et Athénaïs ma collègue dévouée. Merci à vous tous, j'aurai presque pu dire toutes mais la règle du masculin l'emporte d'un point de vue orthographique !) pour nos discussions scientifiques ou presque, pour votre soutien dans les moments les plus durs, pour vos encouragements. Je garde en mémoire tous ces souvenirs inaltérables d'une équipe solidaire.

-Merci au Rotary club et à la Fédération pour la Recherche sur le Cerveau d'avoir financé l'achat du microdissecteur laser.

- Alex, je te réserve, tout de même, un passage particulier pour te remercier pour ta précieuse aide au microdissecteur, vu nos déboires de ces derniers mois. Merci pour ton soutien, ta patience (il en a fallu) et tes qualités humaines d'écoute de doléances.

- Merci au Professeur Roland Liblau et à Sabine Desbois pour l'envoi des lignées de souris DKI.

- Merci à Manu et Claire pour votre accueil, votre disponibilité et évidemment pour votre aide technique !

- Merci à Reynald et Laurent T, de la plateforme pour tous vos conseils en biomol et votre aide technique (je crois que j'ai un sérieux problème avec les machines de haute-technologie).

- Merci à toutes les autres personnes qui ont un jour répondu à une de mes questions ou qui ont pu m'aider sous quelques formes que ce soit Et vous devez être nombreux....

Je tiens également à remercier Messieurs Laurent Lescaudron et Thierry Dintinger pour m'avoir fait découvrir les joies de l'enseignement durant mes 3 années de thèse. Ces moments passés à enseigner m'ont permis de découvrir un autre métier passionnant et de m'évader.

Je tiens à remercier plus particulièrement Thomas pour tes conseils sur les bonnes pratiques en laboratoire et la culture des lymphocytes T ainsi que tes corrections avisées à J-1 des deadlines, Julien mon collaborateur EAE, Séverine mon dinosaure préféré, Angélique ma double-collègue, Serge pour ton esprit Cristina Cordula, les doubles-losers JL, Laetitia la toulousaine, Virginie, Lucile, Coraline et tous ceux qui ont rendu cette thèse mémorable.

Je finirai mes remerciements sur mes collègues par deux personnes exceptionnelles avec qui j'ai eu la chance de partager ces dernières années : Mélanie et Athénaïs. J'ai tellement de bons souvenirs avec vous, de toutes nos missions, de nos pauses déjeuners, de nos sessions Quiz Tower ou shopping. Ma thèse est passée tellement vite auprès de vous. Vous avez été ma bulle d'oxygène ! Mélanie, mon arnaque qui n'en est plus une, je te souhaite le meilleur pour ta fin de thèse et pour la suite. Athé, ma collègue qui n'en est plus une, je te souhaite de vivre la vie dont tu rêves !



Merci aussi à mes amies de longue date ; sans vous, je ne serais sans doute pas arrivée aussi haut : A Natacha pour m'avoir donné le goût des révisions et des longues études... Même si nous aurions été très heureuses ailleurs !!! Tu es vraiment un soutien pour moi et ma force depuis que je te connais. A Jihane, merci de m'avoir fait goûter aux joies des rigolades au travail et après en tant qu'amie, j'espère que tu penseras à moi depuis Baltimore. A Juliette ma copine non-scientifique qui me change les idées mais qui sait quand même me coller sur des questions de médecine, d'ailleurs je compte sur toi le jour J. A Sonya, ma copine exilée qui me manque et enfin à Maïté avec qui j'ai découvert les sciences du laboratoire...

Je ne peux clôturer ces remerciements sans adresser ma plus profonde reconnaissance à ma famille.

Merci Maman pour m'avoir encouragée dans mes études et plus particulièrement sur ces derniers mois. La rédaction de ma thèse a été égayée par tes indispensables corrections. J'ai aimé partager ce moment important de ma vie.

Merci Papa, tu m'as toujours soutenu au cours de mes longues études même si tu ne retiens pas le titre de ma thèse, je ne t'en veux pas!

Merci papy Jean-Claude et mamy Monique, vous êtes les initiateurs de ma réussite.

Merci à mon petit frère ou plutôt félicitations pour tout ce que tu as réussi cette année.

Merci à tonton Yannick d'avoir toujours eu un intérêt développé pour mes expériences.

Merci à ma mamy Lily d'être si courageuse et de nous donner tant d'amour.

Merci à mes beaux-parents Pascale et Jerry d'avoir toujours été là pour moi et à Lancelot, mon deuxième petit-frère.



Je terminerai par vous remercier... Vous mes amours, Pierre et Isaac notre fils, vous me comblez chaque jour de bonheur et tout cela aurait été impossible sans vous. La route fut longue et parfois chaotique pour en arriver jusqu'à là... Mais le meilleur reste à venir...

SOMMAIRE

LISTE DES ABREVIATIONS	9
-------------------------------------	----------

LISTE DES FIGURES.....	12
-------------------------------	-----------

PARTIE 1 - INTRODUCTION GENERALE.....	15
--	-----------

I. La neuroimmunologie : discipline frontière à l'interface entre l'immunologie et la neurobiologie... 16	
A.) Anatomie du système nerveux central	16
B.) Le statut immunologique du système nerveux central	17
C.) La barrière hémato-encéphalique	17
D.) Le drainage lymphatique du SNC	18
E.) Un contexte immunologique de tolérance.....	20
II. Les fonctions immunes des cellules du SNC..... 20	
A.) La microglie	21
B.) L'astrocyte	23
III. La sclérose en plaques : une maladie auto-immune du système nerveux central 26	
A.) Généralités	27
a.) Aspects cliniques.....	27
b.) Origine(s) de la SEP.....	28
B.) Les acteurs cellulaires de la SEP.....	31
a.) La réponse adaptative.....	31
b.) La réponse innée.....	39
IV. Les modèles de neuroinflammation auto-immune ou EAE 40	
C.) Modèle d'EAE dépendant d'une activation par les CMH de classe II.....	42
D.) Modèle d'EAE dépendant d'une activation par les CMH de classe I.....	42

PARTIE 2 - INTERETS DES MODELES ANIMAUX EAE CD8 DEPENDANT	44
--	-----------

I. Introduction	45
A.) Les modèles d'EAE passive et active	45
B.) Les modèles CD8 dépendant transgéniques.....	46
C.) Les modèles humanisés impliquant les LT CD8.....	47
D.) Le modèle viral TMEV.....	47
II. Evaluation de 2 modèles EAE LT CD8 dépendant..... 48	
A.) Le modèle MOG 37-46	48
a.) Matériels et méthodes.....	49
b.) Résultats.....	53
c.) Discussion.....	63
B.) Amélioration du modèle MOG 37-46.....	64
a.) Matériels et méthodes.....	64
b.) Résultats.....	69
c.) Discussion.....	75

III. Le modèle de souris DKI.....	77
A.) Description du modèle de Saxena et al	77
B.) Amélioration du modèle DKI-CL4 : Augmentation de la perméabilité de la BHE	79
a.) Matériels et méthodes.....	79
b.) Résultats.....	82
c.) Discussion.....	88

**PARTIE 3 - LA SIGNATURE MOLECULAIRE DE L'ASTROCYTE DANS LE
MODELE D'EAE MOG 35-55 90**

I. L'astrocyte réactif.....	91
A.) Modifications morphologiques	92
B.) Biochimie de l'astrocyte	95
II. L'astrocyte réactif dans la SEP	95
A.) Réactivité astrocytaire et déclenchement de la maladie.....	96
B.) Les astrocytes et la perméabilisation de la BHE	96
C.) Régulation de l'inflammation	97
D.) L'astrocyte et les médiateurs solubles inflammatoires.....	98
E.) Les astrocytes et la réparation de la lésion.....	100
F.) Les astrocytes et la neurotoxicité	101
III. Analyse de la signature moléculaire de l'astrocyte.....	102
A.) Différentes approches pour étudier la réactivité des astrocytes	102
a.) Analyses par IHC et hybridation <i>in situ</i>	102
b.) Culture in vitro d'astrocytes	103
c.) Isolation par cytométrie de flux.....	103
d.) Isolation par microdissection.....	104
B.) Mise en évidence d'un profil transcriptomique de la réactivité astrocytaire dans le modèle EAE ...	105
a.) Mise au point du protocole de microdissection laser	105
b.) Résultats : article en soumission	111

CONCLUSION..... 140

BIBLIOGRAPHIE 144

LISTE DES ABRÉVIATIONS

ADNc	Acide DésoxyriboNucléique complémentaire
APC	AlloPhycocyAnin
AQP4	Aquaporine 4
ARN	Acide RiboNucléique
BDNF	"Brain-Derived Neurotrophic Factor" ou Facteur neurotrophique dérivé du cerveau
BHE	Barrière Hémato-Encéphalique
CCL-x	C-C motif Ligand
CCR-x	C-C motif Récepteur
CD	Cluster de Différenciation
Cellules ES	Cellules Souches Embryonnaires
CFA	"Complet Freund Adjuvant" ou Adjuvant complet de Freund
CLN-5	Claudine-5
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CMV	Cytomégalovirus
CNTF	"Ciliary Neurotrophic Factor" ou facteur neurotrophique ciliaire
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigène
CTLA-4	"cytotoxic T-lymphocyte-associated protein" ou protéine associée aux LT cytotoxiques
CXCL	C-X-C motif Ligand
DAPI	4',6'-DiAmidino-2-PhénylIndole
DDAO	1,3-Dichloro-9,9-DimethylAcridin-2-one
DL	DyLight
EAE	"Experimental Autoimmune Encephalomyelitis" ou Encéphalyte Autoimmune Expérimentale
EBV	virus d'Epstein-Barr
EDSS	Expanded Disability Status Scale
eGFP	"enhanced Green Fluorescent Protein" ou protéine fluorescente verte améliorée
FACS	"Fluorescence-Activated Cell Sorting" ou cytométrie de flux
FasL	Fas Ligand
FITC	Fluorescéine IsoThioCyanate
FTY-720	Fingolimod
GDNF	"Glial-Derived Neurotrophic Factor" ou Facteur Neurotrophique Dérivé de la Glie
GFAP	"Glial fibrillary acidic protein" ou Protéine Acide Fibrillaire Gliale
GLAST	Glutamate Aspartate Transporteur
GLT-1	Glutamate Transporteur-1
HA	Hémagglutinine
HBSS	Hank's Balanced Salt Solution
HHV-6	Herpès Virus Humain-6
HIF-1	"Hypoxia-Inductible Factor-1" ou Facteur Inductible d'Hypoxie
HLA	"Human Leukocyte Antigène" ou Antigènes des Leucocytes Humains
HTLV-1	"Human T-Lymphotropic Virus" ou Virus T-Lymphotropique Humain type 1
i.p.	Intrapéritonéal
ICAM	"InterCellular Adhesion Molecule" ou molécule d'adhésion intercellulaire
Ig	Immunoglobuline
IHC	ImmunoHistoChimie
IL-x	Inter-Leukine
INF	Interféron
iTreg	Lymphocyte T régulateur induit
KHCO3	Bicarbonate de potassium
LB	Lymphocyte B
LCR	Liquide Céphalo-Rachdien

LCS	Liquide Cérébro-Spinal
LFA-1	"Lymphocyte Function-Associated antigen 1" ou Antigène-1 associé à la Fonction Lymphocytaire
LIF	"Leukemia inhibitory factor" ou Facteur d'Inhibition de Leucémie
LPS	LipoPolysaccharide
LT	Lymphocyte T
MAG	"Myelin-Associated Glycoprotein" ou Glycoprotéine Associée à la Myéline
MBP	"Myelin Basic Protein" ou Protéine Basique de la Myéline
MCP-1	"Monocyte Chemoattractant Protein-1" ou Protéine-1 Chioattractante des Monocytes
MOG	"Myelin Oligodendrocyte Glycoprotein" ou Glycoprotéine de la Myéline des Oligodendrocytes
MT	Mycobacterium Tuberculosis
NA2EDTA	Disodium EthylèneDiamine TétraAcétate
NaCl	Chlorure de Sodium
NDS	"Normal Donkey Sérum" ou sérum d'âne
NFκB	"Nuclear Factor Kappa-b" ou Facteur Nucléaire Kappa-b
NGF	"Nerve Growth Factor" ou Facteur de Croissance Neuronal
NH4Cl	Chlorure d'Ammonium
NMO	NeuroMyélite Optique
NO	"Nitric Oxide" ou oxyde nitrique
nTreg	Lymphocyte T régulateur naturel
OCLN	Ocludine
OVA	Ovalbumine
PAMP	"Pathogen-Associated Molecular Patterns" ou Motifs Moléculaires Associés aux Pathogènes
PBS	"Phosphate Buffered Saline" ou Tampon Phosphate Salin
PE	PhycoErythrine
PET	PolyEthylène Téréphtalate
PFA	ParaFormAldéhyde
PLP	"ProteoLipid Protein" ou Protéine des Protéolipides
PTX	Toxine Pertussique
qPCR	"quantitative Polymerase Chain Reaction" ou Réaction en Chaîne par Polymérase
RIN	"RNA integrity Number" ou nombre d'intégrité de l'ARN
Rnase	Acide Ribonucléase
ROR	"Retinoid-related Orphan Receptor" ou Récepteur Orphelin apparenté aux récepteurs de l'acide Rethinoïque
ROS	"Reactive Oxygen Species" ou dérivé oxydatif de l'oxygène
S1P-R	Sphingosine-1-Phosphate Récepteur
SEP	Sclérose En Plaques
SEP RR	Sclérose En Plaques Rémittente Récurrente
SHH	protéine Sonic HedgeHog
SNC	Système Nerveux Central
STAT3	Signal transducer and activator of transcription 3 ou Transducteur de Signal et Activateur de Transcription 3
TCR	"T-Cell receptor" ou Récepteur des LT
TGF	"Transforming Growth Factor" ou Facteur de Croissance Transformant
Th	Lymphocyte T helper
TLR	Tool-Like Récepteur ou Récepteur de type Toll
TMEV	Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus
TNF	"Tumor Necrosis Facteur" ou Facteur de Nécrose Tumorale
VCAM	"Vascular Cell Adhesion Protein" ou Protéine d'Adhésion des Cellules Vasculaires
VIH	Virus de l'Immunodéficience Humaine
VLA-4	Very Late Antigen-4 ou Antigène très tardif-4

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique (d'après Abbott et al., 2006).....	18
Figure 2 : Représentation schématique du drainage non-conventionnel du SNC.....	19
Figure 3 : Hétérogénéité morphologique de la microglie en fonction du temps ou des stimuli inflammatoires (d'après Aloisi, 2001)	22
Figure 4 : Marquage immunohistochimique anti- GFAP des astrocytes	24
Figure 5 : Représentation des différentes formes de la SEP	28
Figure 6 : Voie de différenciation des LT CD4 helpers.....	32
Figure 7 : Représentation schématique des 4 sous populations de T régulateurs	38
Figure 8 : Incidence de la maladie après immunisation avec les peptides MOG 37-46	54
Figure 9 : Exemple d'histogramme obtenu après analyse cytométrique de la prolifération des lymphocytes T CD8+ avec le peptide MOG 37-46.....	55
Figure 10 : Exemples de réponse proliférative de la fraction LT CD8 des splénocytes chez les souris témoins ou immunisées par le peptide MOG 37-46.	56
Figure 11 : Réponse proliférative des LT CD8 dans les cultures de splénocytes aux peptides de la MOG.....	57
Figure 12 : Exemples d'infiltrats lymphocytaires dans la moelle épinière et le cervelet d'une souris malade immunisée par la MOG 37-46.....	59
Figure 13 : Infiltrat lymphocytaire LT CD4 et LT CD8 dans le nerf optique d'une souris immunisée par la MOG 37-46.....	60
Figure 14 : Exemple de démyélinisation chez une souris malade immunisée par la MOG 37-46.....	61
Figure 15 : Présence de LT activés (OX40+) non-régulateurs (FoxP3-) dans le SNC des souris immunisées MOG 37-46	62
Figure 16 : protocole d'immunisation du « boost »	65
Figure 17 : Exemple de sélection des populations d'intérêt lors de l'analyse cytométrique ...	67
Figure 18 : Sélection des populations cellulaires CD45+/int CD11b+/- à partir d'un extrait de moelle épinière de souris naïve	69
Figure 19 : Le boost entraîne la réactivation et l'infiltration dans le SNC des LT CD8 autoréactifs	70
Figure 20 : Les LT CD8 infiltrants n'ont pas le profil régulateur	71
Figure 21 : Différenciation des LT CD8 naïfs en LT CD8 effecteurs mémoires lors du développement de la maladie	72

Figure 22 : Le boost permet une augmentation progressive du nombre de LT CD8 lors du développement de la maladie	73
Figure 23 : Enrichissement de l'infiltrat en LT CD8 effecteurs mémoires aux dépens des LT CD8 naïfs.....	74
Figure 24 : La présence du marqueur CD69 à la surface des LT CD8 indique que les LT viennent de s'activer.....	75
Figure 25 : fabrication des transgènes DKI (d'après la thèse d'Emilie Bergereau 2009)	78
Figure 26 : Les LT CD3+CD8+ amplifiés acquièrent le phénotype T effecteurs CD44+/CD62L-.....	82
Figure 27: Le transfert passif de lymphocytes autoréactifs anti-HA n'entraîne pas de perte de poids chez les souris DKI naïves.....	83
Figure 28 : Marquage des oligodendrocytes par NogoA	84
Figure 29 : L'irradiation (2Gy) des souris DKI receveuses avant le transfert adoptif des CL-4 TC1, permet l'infiltration de LT CD8 dans le parenchyme nerveux	85
Figure 30 : Détection de LT majoritairement T CD3+CD8- dans les méninges	86
Figure 31 : Visualisation de l'interaction oligodendrocyte-lymphocyte T	87
Figure 32 : Représentation des différents stades d'astroglie	94
Figure 33 : Exemple de régulation de l'expression de certaines molécules dans les astrocytes réactifs.	95
Figure 34 : Intégrité de l'ARN en fonction des additifs utilisés lors du protocole de marquage	107
Figure 35 : Exemple de microdissection des astrocytes au niveau de zones T infiltrées de la substance blanche de la moelle épinière.....	108

PARTIE 1 - INTRODUCTION GENERALE

I. La neuroimmunologie : discipline frontière à l'interface entre l'immunologie et la neurobiologie

Elle porte sur l'étude des interactions entre le système nerveux et le système immunitaire ou du rôle immunitaire des cellules neurales. L'étude des relations entre ces 2 systèmes et les partenaires impliqués est cruciale pour envisager de nouvelles approches thérapeutiques dans le cas de maladies du système nerveux impliquant un dysfonctionnement du système immunitaire.

A.) Anatomie du système nerveux central

Le Système Nerveux Central (SNC) est constitué de l'encéphale (cerveau, cervelet et bulbe rachidien), de la moelle épinière et des nerfs crâniens I et II (nerfs optiques). Le tissu méningé qui entoure le système nerveux central est composé de :

- la dure-mère, la méninge la plus épaisse, fibreuse et rattachée à l'os. Elle constitue les pachyméninges.

- l'arachnoïde, feuillet avasculaire qui tapisse la face interne de la dure-mère et de la pie-mère qui est adhérente au système nerveux central. Ces deux tissus méningés forment ce que l'on appelle les leptoméninges.

Entre l'arachnoïde et la pie-mère se trouve l'espace sub-arachnoïdien qui est occupé par le liquide cérébro-spinal. Ce liquide assure la protection mécanique du système nerveux central et permet aussi la circulation de molécules médiatrices. Il est synthétisé au niveau des plexus choroïdes situés dans les ventricules cérébraux, à partir de la filtration du sang et est résorbé au niveau des sinus veineux.

Au sein du parenchyme nerveux se distingue la substance blanche, où sont regroupés les axones myélinisés, et la substance grise où sont localisés les corps cellulaires des neurones. Les neurones sont entourés de cellules gliales ; cette population hétérogène représente environ 50% du volume et 90% des cellules du cerveau. On distingue 3 types de cellules gliales : les astrocytes, les oligodendrocytes et les cellules microgliales.

B.) Le statut immunologique du système nerveux central

Le SNC est considéré comme un site immuno-privilegié étant donné ses mécanismes inhérents pour restreindre les réponses immunes. Ce concept a été élaboré par Medawar en 1948 sur la base d'observations expérimentales. En effet, il a été observé une survie prolongée de greffons de peau lorsqu'ils étaient injectés directement dans le cerveau alors qu'il existe un rejet rapide par le système immunitaire lorsque ces greffons sont implantés en sous-cutané (Medawar, 1948). Ces premières recherches ont été récompensées par le Prix Nobel de Médecine en 1960. En 1997, l'équipe de Perry montre que l'injection du bacille de Calmette et Guérin dans le parenchyme cérébral ne permet pas une réponse immunitaire efficace. En effet, l'inoculation du pathogène initie le recrutement de macrophages dans le SNC mais ne déclenche pas de réponse lymphocytaire pro-inflammatoire (Matyszak et al., 1997).

La notion d'immuno-privilege central repose également sur la neuro-anatomie du SNC de part l'isolement de ce dernier vis-à-vis du système immunitaire par la barrière hémato-encéphalique, l'absence de drainage lymphatique conventionnel ainsi qu'une faible expression des molécules du Complexe Majeur d'Histocompatibilité (CMH) et le contexte immunologique de tolérance naturelle du SNC.

C.) La barrière hémato-encéphalique

La Barrière Hémato-Encéphalique (BHE) suggérée par Paul Ehrlich à la fin du XIXème a été mise en évidence par l'absence de passage dans le SNC de colorants de forts poids moléculaires tel que le Bleu d'Evans. Elle est constituée de cellules endothéliales et de péricytes entourés d'une lame basale sur laquelle reposent les pieds astrocytaires (Figure 1, Abbott et al., 2006). La présence de jonctions serrées des cellules endothéliales limite le trafic macromoléculaire et cellulaire lui conférant un rôle très important dans l'isolement et la protection du cerveau. Peu de cellules immunitaires migrent dans le SNC, la BHE étant défavorable à leur recrutement (faible expression de molécules de recrutement et d'adhésion).

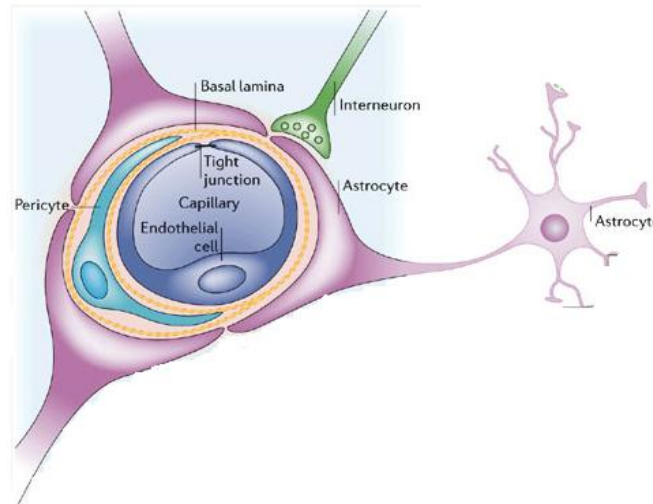


Figure 1 : Représentation schématique de la barrière hémato-encéphalique (d'après Abbott et al., 2006)

La BHE, séparant le SNC de la circulation sanguine, est formée de cellules endothéliales à jonctions serrées, de péricytes et de la lame basale entourée par les pieds astrocytaires

Il existe également une barrière entre la circulation sanguine et le système nerveux central : la barrière sang-Liquide Céphalo-Rachidien (LCR). Cette barrière est formée par les cellules épithéliales et les jonctions serrées des plexus choroïdes. La barrière sang-LCR a une part importante dans l'homéostasie du cerveau.

Il existe cependant 6 zones cérébrales dépourvues de BHE : l'organe subfornical, l'organe vasculaire de la lame terminale, la neurohypophyse, l'épiphyse, l'organe subcommissural et l'area postrema. Ces régions sécrètent dans le sang des hormones (ex : hormones neuroendocriniennes) ou ont une fonction "sensorielle" ; ce sont des zones réceptrices d'hormones peptidiques de haut poids moléculaire.

D.) Le drainage lymphatique du SNC

Il n'existe pas de drainage lymphatique conventionnel dans le SNC. Cependant, Boulton a montré qu'après injection d'albumine dans le cerveau, la protéine est retrouvée dans les ganglions cervicaux (Boulton et al., 1998) indiquant l'existence d'un drainage du liquide intracellulaire cérébral vers les ganglions profonds.

D'autre part, le LCR possède son propre système de drainage au sein du SNC. Il circule dans deux compartiments différents : un compartiment intra-encéphalique fait de cavités épendymaires ou ventricules et un compartiment extra-encéphalique correspondant aux espaces sous-arachnoïdiens.

Le LCR est sécrété, à partir de la circulation sanguine, par les plexus choroïdes comprenant des amas de capillaires entourés par des épendymocytes situés au niveau du système ventriculaire. Ce système est constitué de ventricules cérébraux reliés par des canaux. Le LCR circule entre ces ventricules pour être ensuite résorbé au sommet du crâne au niveau des granulations de Pacchioni ou arachnoïdiennes (Figure 2).

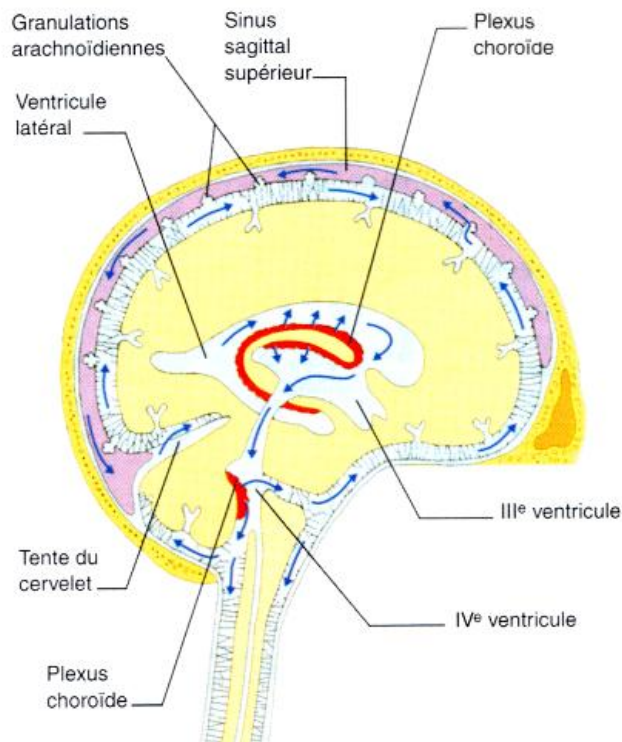


Figure 2 : Représentation schématique du drainage non-conventionnel du SNC

Le LCR est sécrété au niveau des plexus choroïdes. Ce système qui creuse l'encéphale se constitue de grandes cavités « ventricules » reliées entre elles. On distingue le ventricule latéral occupant le centre des hémisphères cérébraux qui est relié au troisième ventricule. Le ventricule III est relié au 4ème ventricule au niveau du tronc cérébral. De là, le LCR va sortir à travers le trou de Magendie pour occuper les espaces sous arachnoïdiens pour être résorbé au niveau des granulations arachnoïdiennes de Pacchioni au sommet du crâne.

Il a été montré qu'il existe un autre type de drainage dans le SNC. En effet, les cellules dendritiques, qui sont les cellules présentatrices d'antigènes professionnelles du système immunitaire, ont la capacité de migrer dans le compartiment du LCR et d'engager une réponse immunitaire. Cependant, les mécanismes de recrutement de cette population cellulaire ne sont à ce jour pas bien définis (Hatterer, 2006).

E.) Un contexte immunologique de tolérance

Le SNC, en plus d'être isolé anatomiquement, se révèle entretenir un statut immunologique latent. Les cellules gliales et endothéliales du SNC présentent faiblement les molécules du CMH et de co-stimulation indispensables à une activation lymphocytaire. Cependant au cours du développement du SNC, l'expression des molécules de CMH au sein du SNC est impliquée dans l'établissement et le remodelage des connexions neuronales au niveau des synapses (Shatz, 2009).

De plus, certaines cellules du SNC sont capables d'exprimer à leur surface Fas Ligand et par conséquent d'induire l'apoptose des lymphocytes T (LT) qui auraient pu traverser la BHE (Choi and Benveniste, 2004). Enfin, très peu de cellules dendritiques, qui sont les cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes, sont retrouvées dans le cerveau ne permettant pas une activation efficace des cellules effectrices dans un contexte non pathologique.

Le statut immunoprivilégié du SNC n'est pas seulement un phénomène passif du à un isolement anatomique, à des déficiences en capacité pro-inflammatoires ou à l'absence de drainage lymphatique conventionnel. En effet, il a été montré qu'il existe un véritable système d'immuno-surveillance régulé et contrôlé par le SNC lui-même. C'est un phénomène actif où certaines cellules gliales jouent un rôle primordial.

II. Les fonctions immunes des cellules du SNC

La microglie et les astrocytes représentent la majorité de la population cellulaire totale du cerveau. Ensemble, elles tiennent un rôle essentiel dans le maintien de l'homéostasie du SNC à l'état normal ou suite à une infection, une lésion ou une agression du SNC.

A.) La microglie

La microglie est impliquée dans les interactions avec le système immunitaire dans le SNC. Elle a été découverte dans les années 1920 par Del Hortega. Elle dérive de macrophages produits lors d'une hématopoïèse embryonnaire précoce dans le sac vitellin (Alliot et al., 1999; Ginhoux et al., 2010). Ces macrophages primitifs migrent dans le tube neural en développement où ils donnent les cellules microgliales. Chez l'homme, on estime que la colonisation du SNC par les progéniteurs microgliaux et la différenciation de la microglie sont achevées à la naissance. On notera qu'il existe d'autres macrophages dans le SNC adulte (dans les méninges, les plexus choroïdes, les espaces périvasculaires) qui eux sont issus de progéniteurs myéloïdes et ont donc atteint le SNC à partir de la circulation sanguine. Cellules microgliales et macrophages infiltrés représentent donc deux pools distincts de macrophages dans le SNC (Ginhoux et al., 2010).

Les cellules microgliales peuvent être assimilées à des macrophages résidents du SNC ayant rôle de cellules effectrices de l'immunité dans le SNC. Elles possèdent la fonction de présentation d'antigènes et de phagocytose et peuvent libérer de nombreux facteurs pro- et anti-inflammatoires. Elles sont des sentinelles qui surveillent en permanence le microenvironnement. En cas de signal de danger, elles peuvent migrer rapidement sur les lieux de la lésion, capturer l'antigène, le présenter et moduler l'environnement par la sécrétion de facteurs pro- ou anti- inflammatoires. En effet, lors d'une perturbation du microenvironnement, la microglie exprime les molécules de CMH-II ainsi que les molécules costimulatrices comme CD80 et CD86. Ainsi, les cellules microgliales ont le potentiel d'activer les LT naïfs et en fonction de la molécule de costimulation exprimée, elles pourront orienter la différenciation des LT dans des voies effectrices ou anergiques (Lynch, 2009).

Chez l'homme, en condition physiologique, les cellules microgliales représentent approximativement 0,5 à 17% de la population cellulaire du parenchyme nerveux selon la région étudiée (Mittelbronn et al., 2001). Cette hétérogénéité spatiale a également été constatée chez la souris, où les cellules microgliales en condition physiologique représentent 5 à 20% de la population cellulaire selon la région étudiée. Chez l'homme adulte sain, il y a, d'une manière générale, plus de cellules microgliales identifiées dans la substance blanche que dans la substance grise (Mittelbronn et al., 2001) alors que c'est l'inverse chez la souris (Lawson et al., 1990). Une hétérogénéité régionale de la densité de la microglie a été également mise en évidence chez la souris (Lawson et al., 1990). Des études

immunohistochimiques ont permis d'identifier trois principaux types morphologiques au sein de ces cellules microgliales adultes : i) ramifié, caractérisé par la présence de nombreux prolongements longs et fins, ii) amiboïde, caractérisé par une forme arrondie ainsi que par la présence de quelques prolongements très courts, iii) et de forme intermédiaire (Kim and de Vellis, 2005).

Dans un cerveau adulte sain, la plupart des cellules microgliales adopte une morphologie ramifiée dans la substance grise ; par contre les cellules microgliales présentent une forme plutôt compacte dans les zones dépourvues de BHE (organe circumventriculaire) et sont plutôt bipolaires dans les zones riches en fibres nerveuses (substance blanche, Lawson et al., 1990). Le terme de «quiescent» que l'on attribuait à la microglie ramifiée "au repos", est en fait peu approprié puisque les cellules microgliales du cerveau sain explorent en permanence le parenchyme cérébral environnant via la mobilité de leurs prolongements. L'état de réactivité des cellules microgliales se manifeste par des modifications à la fois morphologiques et biochimiques. Les cellules microgliales ont différentes compétences en fonction de leur état d'activation (Ransohoff and Perry, 2009; Streit et al., 1999, Figure 3). Au début de leur activation, elles sont capables de présenter l'antigène à leur surface et de produire des facteurs immunitaires (cytokines ou chimiokines), neurotrophiques ou cytotoxiques. A partir d'un stade avancé d'activation, la microglie se polarise et acquiert également la capacité de phagocytose (Figure 3, Aloisi, 2001).

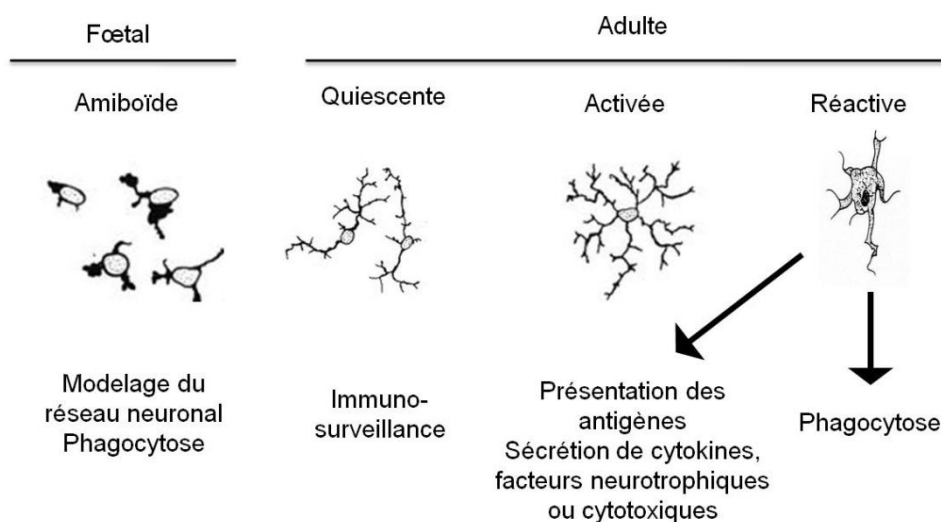


Figure 3 : Hétérogénéité morphologique de la microglie en fonction du temps ou des stimuli inflammatoires (d'après Aloisi, 2001)

Les cellules microgliales sont caractérisées par une grande hétérogénéité. Au cours de la vie de l'individu vont se succéder les cellules microgliales amiboïdes fœtales, les cellules adultes quiescentes, activées et réactives ayant chacune des propriétés différentes dans la neuroinflammation.

Selon l'environnement, les cellules microgliales sécrètent divers facteurs neurotrophiques (BDNF, GDNF, NGF, ou neurotrophines) qui favorisent la survie neuronale et la régénération axonale et/ou d'autres facteurs comme ROS, NO et TNF α qui à forte concentration sont toxiques pour les oligodendrocytes et les neurones (Fernandes et al., 2014). Les cellules microgliales peuvent aussi réguler les réponses inflammatoires par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (TGF β , IL-10) qui inhibent la fonction de présentation d'antigènes, la production de cytokines pro-inflammatoires et l'expression des molécules du CMH ou des molécules de co-stimulation (Lieb et al., 2003). A l'inverse, elles ont la faculté d'orienter une réponse pro-inflammatoire en sécrétant des interleukines (IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-18, IL-23) qui favorisent la différenciation des LT naïfs en T effecteurs en présence de l'antigène et leur survie (Fukaura and Kikuchi, 2003; Murphy et al., 2010; Quintana et al., 2009). Par la sécrétion de chimiokines comme IL-8/CXCL8, IP10/CXCL10 ou RANTES/CCL5, la microglie attire les cellules immunitaires dans le SNC.

La fonction de phagocytose par les cellules microgliales est importante pour l'élimination des éléments synaptiques ou des cellules mortes (Tremblay et al., 2011). Cependant, une récente étude montre que les cellules microgliales sont vite relayées dans ce rôle par les cellules dendritiques dans le SNC (Sosa et al., 2013).

B.) L'astrocyte

Les astrocytes ont été découverts en 1858 par Virchow. Les astrocytes constituent la population la plus abondante des cellules gliales. Parmi les astrocytes, on distingue deux groupes principaux sur la base de leurs différences morphologiques et de leur localisation anatomique : les astrocytes protoplasmiques et les astrocytes fibreux.

Les astrocytes protoplasmiques, prédominants dans la substance grise, sont caractérisés par la présence de multiples prolongements relativement épais et courts rayonnant du corps cellulaire et donnant lieu à de nombreuses ramifications beaucoup plus fines dans leur partie la plus distale. Contrairement à ces derniers, les astrocytes fibreux sont présents dans la substance blanche et se caractérisent par des prolongements moins ramifiés et plus minces. On notera qu'il existe aussi des astrocytes bipolaires (formant la glie radiaire) qui sont abondants pendant le développement et aident la migration neuronale, mais que l'on retrouve aussi dans certaines régions du SNC adulte (substance blanche de la moelle épinière). Il faut

noter également que la conformation spatiale des astrocytes se complexifie au cours de l'évolution. Chez l'homme, l'astrocyte occupe non seulement un espace plus vaste au sein du tissu cérébral, mais présente aussi une plus grande diversité de formes que dans les espèces murines aussi bien dans la substance grise que dans la substance blanche (Giaume et al., 2007; Oberheim et al., 2006).

Une caractéristique cytoarchitecturale importante des astrocytes est la présence de filaments intermédiaires spécifiques constituant le cytosquelette. Le principal filament intermédiaire exprimé par les astrocytes est la « Glial Fibril Astrocytic Protein » (GFAP, Figure 4, Pekny and Pekna, 2004). La GFAP s'est imposée comme le marqueur le plus utilisé pour identifier immunohistochimiquement les astrocytes (Eng et al., 2000). Elle est toutefois relativement peu exprimée dans les astrocytes corticaux en comparaison aux astrocytes de la substance blanche, ce qui a conduit à rechercher d'autres marqueurs de cette population cellulaire (Cahoy et al., 2008).

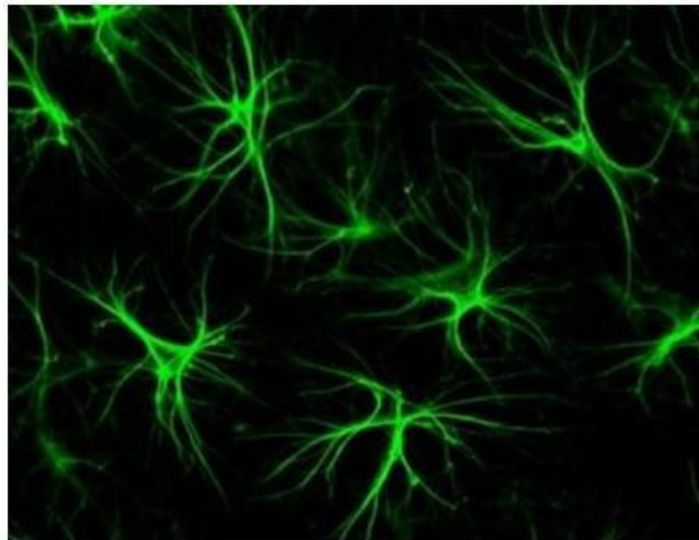


Figure 4 : Marquage immunohistochimique anti- GFAP des astrocytes

Les astrocytes sont spécifiquement marqués avec un anticorps fluorescent anti-GFAP. Ils ont généralement la forme d'étoile d'où leur étymologie en grec : *Astro* - étoile et *cyte* - cellule.

Les astrocytes ont longtemps été considérés comme de simples cellules de maintien. De nombreuses études ont maintenant montré qu'ils ont de multiples fonctions dans le SNC (Taber and Hurley, 2008). Les astrocytes jouent un rôle majeur dans l'homéostasie du SNC. La BHE permet de régler les flux de migration de la circulation sanguine vers le micro-

environnement neuronal. Les astrocytes régulent les fluctuations au niveau local en modulant l'excès de neurotransmetteurs. Les astrocytes captent le glutamate via les transporteurs GLAST (Glutamate Aspartate Transporter) et GLT-1 (Glutamate Transporter-1), puis le métabolisent en glutamine via la glutamine synthase (Danbolt, 2001). Ils peuvent aussi influencer l'activité synaptique et le flux sanguin (Kimelberg and Nedergaard, 2010).

Les astrocytes jouent également un rôle primordial dans le maintien et la structuration de la BHE. Leurs pieds astrocytaires en contact avec les cellules endothéliales et les péricytes forment la BHE. Ainsi, ils influencent directement la perméabilité de la barrière via la sécrétion de facteurs astrocytaires (Aloisi, 2001). *In vitro*, les astrocytes régulent la fonction des jonctions serrées des cellules endothéliales via la sécrétion de nombreux facteurs astrocytaires tels que l'endothéline-1, IL-1 β , IL-6, Tumor Necrosis Factor alpha (TNF α) ou des chimiokines comme MCP1/CCL2, qui désorganisent les protéines des jonctions serrées augmentant ainsi la perméabilité de la BHE (Abbott et al., 2006; Stamatovic et al., 2005; Yao and Tsirka, 2011).

Une récente étude montre que la protéine Sonic HedgeHog (SHH) sécrétée par les astrocytes favorise la formation de la BHE et son intégrité ; l'inhibition spécifique de la voie de signalisation SHH sur les cellules endothéliales de la BHE favorise le passage des cellules lymphocytaires dans le SNC dans un modèle murin de démyélinisation auto-immune (Alvarez et al., 2011).

Les astrocytes peuvent aussi affecter le passage des cellules immunitaires dans le SNC via la BHE en régulant à leur surface l'expression de molécules d'adhésion (Gimenez et al., 2004; Sobel et al., 1990). En condition inflammatoire, ils peuvent en particulier exprimer les molécules d'adhésion ICAM-1 et VCAM-1 qui se lient aux récepteurs LFA-1 et VLA-4 des lymphocytes afin de provoquer leur adhésion et faciliter ainsi leur passage dans le parenchyme nerveux. A l'inverse, ils peuvent bloquer le passage de LT infiltrants en induisant l'apoptose de ces derniers via l'expression astrocytaire de ligand FAS (FAS-L ou CD95L). Ce mécanisme de mort cellulaire induite a été décrite *in vitro* et *in vivo* dans un modèle murin d'encéphalomyélite (Bechmann and Nitsch, 2001; Pender et al., 1991; Wang et al., 2013).

Les astrocytes seraient aptes à jouer un rôle dans la réponse immunitaire adaptative via leur capacité à présenter l'antigène, *in vitro*. Cependant, bien que les astrocytes soient capables d'exprimer à leur surface des molécules de costimulation (CD40, CD80 et CD86)

ainsi que des molécules CMH-I et II *in vitro* après stimulation par $\text{INF}\gamma$ (Aloisi et al., 1992; Cabarrocas et al., 2003; Dong and Benveniste, 2001), leur capacité de présentation de l'antigène *in vivo* n'est pas bien définie et même très controversée (Kort et al., 2006; Zeinstra et al., 2000; Chas). Des astrocytes ayant internalisé des débris de myéline ont été néanmoins retrouvés dans les lésions aiguës de patients atteints de la SEP (Lee et al., 1990).

In vitro, les astrocytes sont capables de phagocyter des LT encéphalogéniques mais de façon beaucoup moindre que la microglie (Magnus et al., 2002). En présence d' $\text{INF}\gamma$, *in vitro*, l'expression de molécules du CMH est induite et les astrocytes ont la capacité à présenter l'antigène à des lymphocytes activés mais pas à des lymphocytes naïfs (Aloisi et al., 1999; Øren et al., 2004). Cependant, leur capacité de processing de l'antigène se limite à des séquences peptidiques et ils ne sont pas capables de présenter l'antigène à partir d'une protéine entière (Kort et al., 2006). Ce processus de présentation d'antigène n'a pas été démontré dans l'astrocyte dans des conditions non inflammatoires. Ce sont la microglie et surtout les macrophages périvasculaires puis les cellules dendritiques infiltrées qui remplissent la fonction de présentation de l'antigène *in situ* lors d'une réponse immunitaire dans le cerveau (Sosa et al., 2013).

De part leur capacité à produire de multiples cytokines pro- ou anti-inflammatoires, les astrocytes peuvent influencer spécifiquement la réaction inflammatoire, suite à une stimulation par des cytokines lymphocytaires ($\text{TGF}\beta$, $\text{INF}\gamma$, $\text{TNF}\alpha$) *in vitro* et *in vivo* dans les modèles de maladies neuroinflammatoires (Gimsa et al., 2013).

III. La sclérose en plaques : une maladie auto-immune du système nerveux central

La Sclérose En Plaques (SEP), décrite pour la première fois au XIX^{ème} par Charcot, est une maladie inflammatoire, démyélinisante et dégénérative du SNC. Différents arguments sont en faveur d'une attaque auto-immune spécifique du SNC (Compston and Coles, 2002). De récentes études génétiques indiquent qu'un dérèglement du système d'immunosurveillance pourrait y être associé et favoriser l'apparition de la maladie (Barcellos et al., 2003; Ramagopalan et al., 2008; Sawcer et al., 2014). Ce dérèglement pourrait être dû à une modification de la composition du microenvironnement du SNC, à des interactions

inappropriées entre les cellules du SNC et celles du système immunitaire, ou à des activations aberrantes de cellules jouant un rôle majeur dans le privilège immun.

A.) Généralités

a.) Aspects cliniques

LA SEP débute le plus souvent chez le jeune adulte (entre 20 et 40 ans) avec une prédilection pour le sexe féminin (3 femmes pour 1 homme). Elle correspond à une atteinte de la myéline du SNC provoquant une perturbation de la conduction saltatoire et par conséquent, de la communication nerveuse. Son incidence est d'environ 7 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants. La prévalence de la SEP en France est évaluée à 6,8 pour 100 000 (Fromont et al., 2012). Chez 50 % des patients atteints de la SEP, un handicap permanent avec dépendance d'au moins une aide à la marche est observé après 15 ans de maladie. Cette pathologie représente la première cause de handicap non traumatique chez l'adulte jeune. La SEP se manifeste par une symptomatologie variée, associant des symptômes physiques (paraparésie, ataxie, troubles visuels, troubles de l'équilibre) à des troubles cognitifs, des troubles sensoriels et de la fatigue.

Dans 85% des cas, la SEP évolue sous la forme de poussées successives. Il s'agit de la **forme Rémittente (RR)**. Une poussée est définie par l'apparition ou l'aggravation en quelques heures à quelques jours, de signes ou de symptômes neurologiques. Habituellement, la durée d'une poussée est de quelques jours à deux à trois semaines, puis les signes régressent totalement ou partiellement. Généralement, après 15 ans d'évolution, la maladie évolue en une **forme Secondairement Progressive (SP)** pour la moitié des patients : les poussées deviennent plus rares ou disparaissent totalement pour céder la place à une progression continue des signes neurologiques (Confavreux et al., 2000). La progression est définie par l'aggravation de signes neurologiques sur une période de 3 à 6 mois, sans retour à l'état neurologique antérieur. Dans 15% des autres cas (principalement lorsque la maladie débute après 40 ans), les symptômes s'installent d'emblée sur un mode progressif en quelques mois. Des poussées surajoutées sont possibles mais rares. On parle de la SEP **Primitivement Progressive (PP)** (Figure 5).

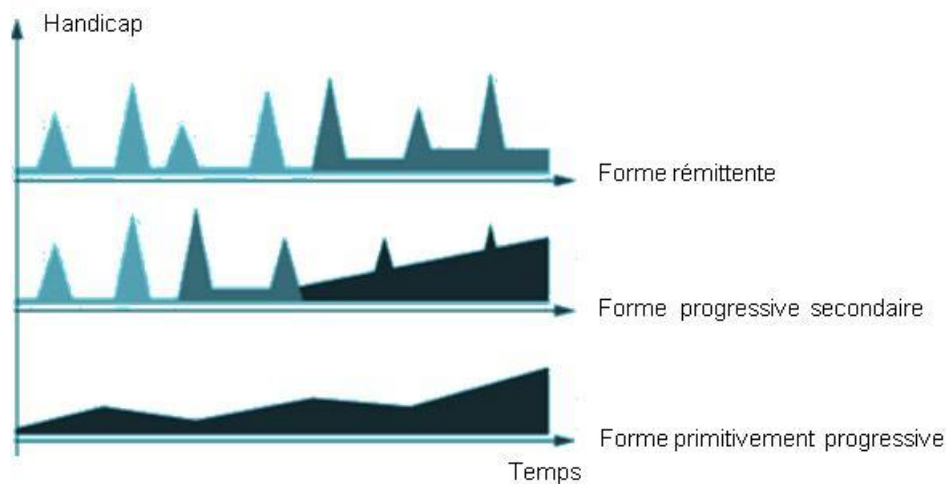


Figure 5 : Représentation des différentes formes de la SEP

La pathologie évolue sous plusieurs formes et en différentes phases. La plus fréquente est la forme rémittente alternant phases de poussée et de rémission. Ensuite, il existe les formes soit primitivement soit secondairement progressives entraînant une aggravation régulière de la maladie.

En l'absence de marqueur para-clinique, le diagnostic de la SEP repose sur des critères diagnostiques consensuels récemment révisés pour tenir compte de l'avancée des techniques médicales (Polman et al., 2005) :

- Survenue chez un sujet de signes cliniques ou symptômes neurologiques compatibles avec un mécanisme inflammatoire. A ce stade, on parle aujourd'hui de premier événement démyélinisant ou de syndrome clinique isolé.

- Présence de lésions dans la substance blanche lors d'un examen par Imagerie par Résonance Magnétique (IRM).

b.) Origine(s) de la SEP

Bien que la maladie soit décrite depuis le 19^e siècle, les causes de la SEP restent inconnues à ce jour. Les récentes données indiquent que le déclenchement de la maladie est favorisé par certains facteurs génétiques, des facteurs environnementaux et très probablement par des facteurs infectieux, notamment viraux. En effet, on constate que lorsqu'un jumeau est

malade, le risque pour des faux jumeaux (hétérozygote) est pour l'autre de 5% de développer la maladie, alors qu'il est de 25 % pour de vrais jumeaux (monozygote). Le premier facteur génétique mis en évidence est le complexe Human Leukocyte Antigen (HLA), avec une très forte relation entre la susceptibilité à développer la maladie et la présence des polymorphismes HLA-DQB1*0602, HLA-DQAI*0102, HLADRB1*1501 ou HLA-DRB5*0101 (Gourraud et al., 2012).

D'autres associations génétiques avec les gènes codant les cytokines (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 ou TNF α), leurs récepteurs (IL-7R ou IL-2RA), les chimiokines (CCR5) ou les molécules de co-signalisation lymphocytaire (CTLA-4) ont été ensuite rapportées (Ramagopalan et al., 2008). L'étude à grande échelle réalisée par le consortium international a confirmé que les gènes du HLA sont impliqués dans le développement de la maladie ainsi que de nombreux gènes engagés dans des voies immunologiques tel que celle de la différenciation des LT régulateurs (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium et al., 2011; McDonnell et al., 1999; Sawcer et al., 2014).

En dehors du CMH, l'influence de chaque facteur génétique de susceptibilité est en fait relativement faible. Outre la prédisposition génétique, les facteurs environnementaux pourraient en association contribuer de façon tout aussi importante au développement de la maladie. Il a ainsi été montré une disparité de l'incidence en fonction de la distribution géographique des patients. Cette analyse démontre l'importance des facteurs environnementaux dans la pathogénie de la SEP. En effet, la prévalence de la pathologie est élevée dans les pays du nord de l'Europe (>1 pour 1 000 habitants) contrairement aux fréquences retrouvées dans les régions situées plus au sud ou parmi les populations d'Asie ou d'Afrique noire (Rosati, 2001). Ce gradient Nord-Sud est également retrouvé pour la France (Fromont et al., 2012; Orton et al., 2011). L'exposition solaire et la synthèse de vitamine D semblent jouer un rôle protecteur important dans cet effet. A ce jour, aucun facteur environnemental précis n'a été incriminé de façon directe dans la survenue de la SEP. Différentes pistes sont néanmoins très étudiées, comme l'infection par certains virus (EBV, HHV6...), l'exposition solaire, la carence en vitamine D, ou encore l'hypothèse hygiéniste (Laplaud and Confavreux, 2006). En effet, le risque de la SEP tend à diminuer chez les populations migrantes de haute à basse latitude (Ascherio et al., 2010). La supplémentation en vitamine D réduit l'inflammation au niveau du SNC (Kimball et al., 2011) et est souvent administrée chez les patients atteints de la SEP dans les pays du Nord de l'Europe.

Un rôle possible des agents potentiels infectieux est aussi évoqué dans le déclenchement de la SEP par la rupture de la tolérance du SNC. Diverses maladies humaines virales sont associées à un processus de démyélinisation, suite à l'infection par le virus de la leucémie/lymphome T humaine de type 1 (HTLV-1), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus JC ou le virus de la rougeole (Herman et al., 2001). L'implication du virus d'Epstein-Barr (EBV) est le plus souvent évoqué (Levin et al., 2005; Pender, 2011) car des bandes oligoclonales contre les antigènes de ce virus sont identifiées dans le LCR des patients atteints de la SEP (Serafini et al., 2007). Ces résultats ont été très discutés et critiqués et des études indépendantes n'ont pu les reproduire. Aucune étude n'a pu incriminer de façon formelle cet agent infectieux dans le développement de la pathologie. Pourtant 100% des patients atteints de la SEP sont EBV positif alors que seulement 90% de la population générale est EBV positif. Cependant, l'analyse post-mortem d'une cohorte de 24 patients a démontré que l'EBV est absent de la plupart des lésions (Willis et al., 2009). Néanmoins, dans un travail anatomo-pathologique plus récent, la présence de LB infectés par l'EBV était spécifiquement retrouvée dans les lésions actives de la SEP, mais aussi dans quelques contrôles non SEP, venant ainsi soutenir l'hypothèse de Serafini et collaborateurs sur l'importance de l'implication de l'EBV dans la SEP (Tzartos et al., 2012). Une réponse des LT CD8 envers l'EBV a aussi été démontrée chez des patients atteints de la SEP (Angelini et al., 2013). L'ensemble de ces arguments suggère que l'infection par l'EBV participe au développement de la SEP sans en être une cause.

Un autre virus, le cytomégalovirus (CMV), pourrait aussi avoir une influence dans le développement de la SEP en modulant la réponse immunitaire. Un rôle protecteur a été mis en évidence dans le modèle animal de la SEP induit par le virus de Theiler (TMEV). En effet, une infection simultanée avec le CMV murin atténue l'EAE (Pirko et al., 2012). Cependant à ce jour, aucun lien n'a été mis en évidence entre la séroposivité au CMV et à la SEP (Pakpoor et al., 2013) même si l'équipe de Zivadinov a montré que les patients atteints de la SEP ayant une séroposivité au CMV développaient la maladie plus tardivement avec un faible EDSS et des poussées moins fréquentes par rapport aux patients séronégatifs (Zivadinov et al., 2006).

A ce jour, toutes ces données indiquent que le développement de la maladie est influencé non seulement par des facteurs génétiques mais également par des facteurs exogènes, dépendants de l'environnement. C'est pourquoi on dit que la SEP est d'origine "multifactorielle".

B.) Les acteurs cellulaires de la SEP

Sur le plan neuroanatomopathologique, la SEP se caractérise par la présence de plaques de démyélinisation au sein de la substance blanche du SNC, avec une dégénérescence axonale qui peut aussi apparaître très rapidement. Les plaques sont caractérisées par la présence d'un infiltrat de cellules immunitaires principalement composé de macrophages et de LT (Compston and Coles, 2002; Nylander and Hafler, 2012). Cependant, à ce jour le mécanisme exact et l'origine de la maladie sont toujours inconnus même si de nombreux acteurs de l'immunité adaptative et innée sont maintenant incriminés.

a.) La réponse adaptative

1.) Les lymphocytes T

Les LT jouent un rôle essentiel dans la maladie. Des études ont montré leur présence dans les lésions des patients atteints de la SEP, avec une répartition oligoclonale suggérant une sélection antigène-dépendante (Babbe et al., 2000; Junker et al., 2007; Montes et al., 2009). Parallèlement, il a été retrouvé des lymphocytes autoréactifs envers la myéline dans le sang ou le LCR des patients atteints de la SEP. Cependant, ces résultats sont soumis à controverse puisque des LT autoréactifs circulants ont été isolés chez des sujets sains n'entraînant aucune pathologie. La différence entre les patients et les témoins semble être plus qualitative que quantitative. Afin de valider cette différence, les travaux ont été effectués à partir de différents antigènes peptidiques dérivant de la myéline (MOG, PLP, MBP) présentés aux LT issus du sang des patients (Elong Ngonu et al., 2012).

→ Implication des LT CD4 Th1 et Th17

De nombreuses études *in vitro* et chez l'animal montrent clairement l'implication des LT CD4 dans l'étiopathologie de la SEP. Les LT CD4 reconnaissent un peptide lorsque celui-ci est présenté par le CMH de classe II présent sur des Cellules Présentatrices d'Antigène (CPA) spécialisées. Les antigènes sont usuellement dérivés à partir d'antigènes exogènes capturés et processés par les CPA. Premièrement, les études génétiques ont permis d'associer très tôt certains variants du complexe CMH-II au développement de la maladie (Barcellos et al., 2003, 2006; McDonnell et al., 1999). Le rôle délétère de certains haplotypes HLA-DR2

comme le DRB1*1501 et DRB5*01:01 a été démontré *in vivo* à l'aide des souris humanisées exprimant spécifiquement un de ces HLA avec un TCR (T-cell Recepteur) spécifique d'un antigène de la myéline : 4 % de ces souris développent spontanément une encéphalomyélite et une expression plus forte de ces HLA favorise le développement de la maladie induite par l'antigène (Fugger et al., 2009; Madsen et al., 1999; Quandt et al., 2004).

Ces données génétiques sur la prépondérance de certains haplotypes HLA chez les patients atteints de la SEP avec les modèles animaux (description dans le chapitre suivant) ont tout d'abord suggéré que l'initiation de la SEP serait essentiellement médiée par les LT CD4.

Les Th1 (type T helpers), premier type de LT CD4 identifié, sont des cellules T effectrices qui favorisent les réponses immunitaires à médiation cellulaire impliquées normalement dans la défense de l'hôte contre les agents pathogènes. Les cellules Th1 sécrètent notamment l'IFN γ , IL-2, et TNF α . Ces cytokines dites pro-inflammatoires favorisent l'activation des macrophages, la production d'oxyde nitrique ou la prolifération de LT cytotoxiques, aidant ainsi à la phagocytose et à la destruction des agents pathogènes microbiens. Les cellules Th1 ont la caractéristique d'exprimer le facteur de transcription T-bet (Figure 6).

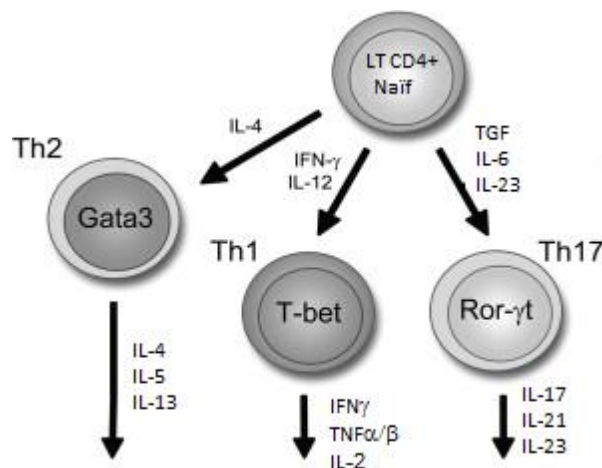


Figure 6 : Voie de différenciation des LT CD4 helpers

La différenciation des LT est le phénomène par lequel un lymphocyte T naïf acquiert des capacités effectrices particulières, en fonction de son environnement d'activation. Les sous-populations de T se différencient en fonction des cytokines qu'elles sécrètent. Sous l'influence d'IFN γ et IL-12, les LT CD4 se différencient en Th1 sécrétant de l'IFN γ , du TNF α et de l'IL-2. En présence de TGF, d'IL-6 et d'IL-23, de l'IL-17, il y a différenciation des LT CD4 en Th17 synthétisant l'IL-21 et de l'IL-23. Le profil Th2 est obtenu, sous l'action de l'IL-4, et permet la synthèse d'IL-4, d'IL-5 et IL-13.

L'IFN γ a été identifié dans des lésions de patients atteints de la SEP (Traugott and Lebon, 1988) et son administration aggrave la maladie (Panitch et al., 1987). Chez les patients, l'augmentation d'IFN γ et d'IL-12 dans le SNC et le LCR est un facteur aggravant de la maladie (Petermann and Korn, 2011).

L'implication des Th1, dans la physiopathologie, a été mise en évidence dans le modèle animal de la SEP. En effet, le transfert passif de LT CD4 Th1 autoréactifs envers des antigènes de la myéline induit chez des animaux sains le développement d'une encéphalomyélite (Lassmann, 2007). De plus, l'induction de la maladie par immunisation avec un peptide de la myéline est inhibée lorsque les souris ne synthétisent plus le facteur de transcription T-bet (T-Bet $^{-/-}$, Bettelli et al., 2004). Enfin, une encéphalomyélite spontanée peut être obtenue dans une petite proportion des animaux transgéniques surexprimant un TCR d'un antigène de la myéline sur les LT CD4 (Attfield and Fugger, 2013).

Comme nous l'avons déjà vu dans le chapitre précédent, l'IFN γ augmente la capacité de présentation des CPA et l'expression de cytokines inflammatoires par les cellules gliales mais agit également directement sur les oligodendrocytes. Ainsi, une étude *in vitro* montre que l'IFN γ sensibilise les oligodendrocytes à l'apoptose induite par Fas via une augmentation de l'expression du Fas Ligand à leur surface (Pouly et al., 2000). Cependant, des études ultérieures ont montré que cette cytokine et cette sous-population Th1 n'étaient pas les seules impliquées (Petermann and Korn, 2011) car les souris IFN $\gamma^{-/-}$, IFN γ R $^{-/-}$ et IL-12p35 $^{-/-}$ n'étaient pas résistantes à l'induction de la maladie, voire même hypersusceptibles (Ferber et al., 1996; Willenborg et al., 1996). L'IL-12p35 est une sous-unité de la cytokine active hétérodimérique IL-12 comportant également IL-12p40. Quelques années plus tard, il a été démontré que cette sous-unité p40 avait aussi la propriété de se lier à une autre sous-unité p19 pour former une autre cytokine biologiquement active qui est l'IL-23. Cette cytokine est impliquée dans le processus de différenciation des LT CD4 en Th17 qui sécrètent une autre cytokine, l'IL-17. Les Th17 expriment le facteur de transcription et de différenciation ROR γ t et sécrètent également les cytokines IL-21 et IL-23. De nombreuses données chez l'animal ont alors suggéré l'implication importante de la population Th17 dans la physiopathologie de la SEP (Hofstetter et al., 2009). Les souris déficientes en p19 sont complètement résistantes à l'induction de l'EAE (Chen et al., 2006) indiquant l'importance de l'IL-17 et donc des Th17 dans la physiopathologie. Les Th17 ont un rôle pro-inflammatoire important et sont également impliqués dans la protection lors d'infections bactériennes ou fongiques en

favorisant le recrutement de neutrophiles sur le site d'infection (Bettelli et al., 2006a; Ivanov et al., 2006; Veldhoen et al., 2006) .

Ainsi, des LT Th17 sont retrouvés dans le SNC chez des animaux EAE induits par immunisation avec la myéline et dans le cerveau de patients atteints de la SEP (Hofstetter et al., 2009). L'IL-17 est effectivement surexprimé dans les lésions SEP. Le transfert des Th17 autoréactifs envers des antigènes du SNC déclenche une neuroinflammation démyélinisante chez l'animal (Langrish et al., 2005) et les anticorps anti-IL-17 inhibent la maladie induite par immunisation chez l'animal (Hofstetter et al., 2005).

Chez l'homme, le nombre de cellules exprimant le gène de l'IL-17 est augmenté dans le sang des patients par rapport aux témoins (Matusevicius et al., 1999). Plus le nombre de ces cellules est important chez les patients, plus leur score clinique est élevé et la fréquence des Th17 dans le LCR est augmentée lors des poussées (Brucklacher-Waldert et al., 2009).

A l'heure actuelle, la dichotomie entre ces deux sous-populations Th1 et Th17 dans la physiopathologie de la SEP reste floue car les Th17 peuvent se convertir sous l'effet de l'IL-12 ou de $TNF\alpha$ en Th1, appelés alors Th1 non conventionnels encore plus pathogéniques (Cosmi et al., 2014).

→ Implication des LT CD8

Les LT CD8 ont longtemps été ignorés dans les recherches sur l'auto-immunité et la SEP. D'une part, le TCR des LT CD8 s'associe avec les peptides apprêtés par les molécules de CMH de classe I et peu de maladies auto-immunes associent génétiquement ce CMH comme cela est indiqué pour le CMH-II. D'autre part, les modèles animaux permettant d'aborder le rôle des LT CD8 ont été développés bien après les modèles impliquant les Th1.

Après leur activation, les LT CD8 se différencient en cellules effectrices cytotoxiques produisant fortement l' $IFN\gamma$ et le $TNF\alpha$ ainsi que la perforine, le granzyme B et Fas. Le rôle des LT CD8 en périphérie est de protéger l'hôte lors d'infections (virales notamment) en tuant les cellules infectées. Après leur intense prolifération (et résolution de l'infection), la plupart des LT CD8 activés entre en apoptose, mais environ 10% se différencient en LT CD8 mémoires qui peuvent se réactiver rapidement en cas de réinfection (une étape contrôlée par les LT CD4 helpers). Cette propriété de mémoire pourrait être délétère dans les maladies

auto-immunes, car les LT CD8 mémoires pourraient cross-réagir avec des antigènes du soi (théorie du mimétisme moléculaire).

Chez les patients atteints de la SEP, la fréquence des LT CD8 est souvent plus élevée que celle des LT CD4 dans les lésions du parenchyme nerveux (Babbe et al., 2000; Salou et al., 2013). De plus, une expansion oligoclonale des LT CD8 est plus fréquemment retrouvée que pour les LT CD4 dans les zones inflammées du SNC, le LCR et le sang (Jacobsen et al., 2002; Salou et al., 2013; Skulina et al., 2004). Ces données suggèrent un rôle important des LT CD8 reconnaissant un antigène particulier dans la SEP.

On considère de plus que les LT CD8 ont une meilleure fonction cytotoxique que les LT CD4, et sont plus aptes à provoquer des atteintes au SNC pour différentes raisons. D'une part, les oligodendrocytes (et certains neurones) expriment à l'état basal le CMH-I et sont donc particulièrement sensibles à l'attaque par des LT CD8 activés (Jurewicz et al., 1998; Medana et al., 2000). Des LT CD8 répondant à certains épitopes de protéines de la myéline (MBP, PLP et MAG) restrictifs au HLA de type I ont été décrits chez les patients atteints de la SEP. De plus, la fréquence des LT CD8 autoréactifs envers la myéline augmente en périphérie chez les patients atteints de la SEP (Bahbouhi et al., 2009; Zang et al., 2004).

Plus récemment que pour les LT CD4, l'implication des LT CD8 autoréactifs dans le processus pathologique de la SEP a été démontrée dans des modèles animaux (Friese and Fugger, 2009). Les travaux originaux ont indiqué que le transfert de LT CD8 autoréactifs envers des protéines de la myéline déclenche une encéphalomyélite auto-immune (Huseby et al., 2001; Ji and Goverman, 2007; Sun et al., 2001) même si, dans certaines de ces études, une contamination par des LT CD4 autoréactifs ne peut pas être exclue ou si la maladie était obtenue uniquement dans un animal immunodéprimé.

Dans l'ensemble, il est vraisemblable que les LT CD4 et les LT CD8 jouent un rôle dans la pathogénèse de la SEP.

2.) Les lymphocytes B et leurs anticorps

Depuis plusieurs décennies, la présence abondante d'Immunoglobulines (Ig) sous forme de bandes oligoclonales dans le LCR des patients atteints de la SEP en phase de rechute (Kabat et al., 1950) a suggéré l'implication des lymphocytes B (LB) et de la réponse humorale dans la

pathologie. De plus, le fait que le traitement par Rituximab (un anticorps monoclonal anti CD-20 déplétant spécifiquement les LB) réduise les lésions actives ainsi que les poussées chez des patients atteints de la SEP RR, appuie fortement cette hypothèse.

Physiologiquement, le LB ne peut pas interagir avec la BHE et la franchir. Or, il a été observé une augmentation du taux d'Ig dans le LCR des patients alors que cette augmentation n'est pas retrouvée dans le sérum de ces mêmes patients. Ces données indiquent que des LB peuvent franchir la BHE ou la barrière hémato-méningée et produire des anticorps dans le SNC. Des LB, des plasmocytes et des anticorps spécifiques de la myéline, ont été retrouvés dans des lésions actives ou en marge des lésions chroniques actives chez des patients atteints de la SEP (Genain et al., 1999). De plus, il existe des follicules ectopiques B dans les méninges chez 41% des patients atteints de la SEP de forme secondairement progressive ; leur présence est corrélée avec les zones de forte démyélinisation (Magliozzi et al., 2007). L'analyse de la séquence de la région variable des immunoglobuline (Ig) montre une expansion clonale de LB mémoires exprimant la chaîne variable lourde de type 4 dans le LCR (Qin et al., 1998) ou directement dans les lésions (Baranzini et al., 1999), indiquant que la réponse humorale est spécifique d'un antigène particulier.

Les LB peuvent contribuer à la neuroinflammation de différentes façons. D'une part, ils peuvent se différencier en plasmocytes sous l'influence de lymphocytes auxiliaires activés. En effet, dans le modèle murin de la SEP (Delarasse et al., 2013) comme dans la SEP (Wucherpfennig et al., 1997), il peut exister une similitude entre les épitopes reconnus par LB et T autoréactifs. Les LT autoréactifs peuvent alors entretenir la prolifération des LB et leur activation en plasmocytes qui produisent les anticorps. La production de certains anticorps spécifiques de la myéline pourrait provoquer la destruction de la myéline en favorisant sa phagocytose après opsonisation (Trotter et al., 1986) ou via l'activation du complément (Mead et al., 2002). L'administration de tels anticorps augmente la démyélinisation dans les modèles animaux (von Büdingen et al., 2011). De plus, des études ont montré la présence de compléments activés dans les zones de démyélinisation (Lucchinetti et al., 2000) et dans le LCR en corrélation avec le score clinique des patients (Sellebjerg et al., 1998).

L'implication systématique d'anticorps démyélinisant dans la physiopathologie de la SEP ne peut concerner qu'une sous-classe de patients atteints de la SEP. Cependant, d'autres fonctions des LB pourraient être altérées. En effet, les LB peuvent présenter l'antigène aux LT CD4, costimuler les LT CD4 autoréactifs et favoriser leur recrutement au sein de

l'inflammation dans le SNC via la sécrétion de cytokines et chimiokines (Duddy et al., 2004; Harp et al., 2010; Lou et al., 2000). D'ailleurs, c'est probablement cette fonction des LB que cible le Rituximab (anticorps monoclonal dirigé contre la molécule CD20) car le taux d'anticorps reste inchangé durant le traitement (Hauser et al., 2008) alors que l'activité pro-inflammatoire des LT Th1 et Th17 diminue (Bar-Or et al., 2010).

Les études réalisées dans le modèle EAE confirment le rôle des LB et suggèrent qu'ils peuvent exercer des fonctions régulatrices ou pathogéniques. L'immunisation active de souris transgéniques déficientes en LB ne montre pas une modification sur le développement de la maladie. Cependant, l'absence de LB dans ces souris est corrélée avec l'absence de phase de rémission chez les animaux. L'équipe de Wolf a montré que ce rôle régulateur des LB était dû à la production d'IL-10 (Wolf et al., 1996). Une autre technique a été utilisée pour dépléter les LB, l'utilisation d'un anticorps anti-CD20. L'utilisation de cet anticorps dans un modèle d'EAE active initiée par l'immunisation avec le peptide MOG 35-55 est un facteur aggravant la maladie de part la diminution d'une sous-population de LB IL-10+. A contrario, lorsque la déplétion de LB a lieu, dans le même modèle, après le premier pic de la maladie, ceci permet une amélioration de l'EAE associée à la réduction de la prolifération des LT naïfs (Matsushita et al., 2008). Ces résultats montrent que le rôle des LB peut différer en fonction du stade de la maladie.

Une étude comparant l'effet de l'absence de LB dans un modèle immunisé avec la protéine recombinante MOG (rMOG) ou bien le peptide MOG explique le mode d'action des LB dans l'EAE. En effet, la déplétion des LB, avant ou après le déclenchement des premiers symptômes, entraîne une aggravation de la maladie dans le modèle avec le peptide MOG alors qu'il induit une amélioration chez les souris immunisées avec rMOG. Ces observations suggèrent que les LB participent à la régulation du processus physiopathologique (Weber et al., 2010). En utilisant des souris BCR Tg anti-MOG ayant la propriété d'être incapable de sécréter l'anticorps anti-MOG, Molnarfi et ses collaborateurs ont démontré le rôle important des LB en tant que cellules présentatrices d'antigène pouvant processor et présenter la protéine MOG (Molnarfi et al., 2013). Enfin, la capacité de coopération LB/T a déjà été démontrée précédemment, dans un modèle double-transgénique où les souris présentent la combinaison de TCR et BCR transgéniques anti-MOG avec production importante d'anticorps. Les souris double Tg développent une EAE spontanée contrairement au modèle EAE TCR transgénique seul (Bettelli et al., 2006b; Krishnamoorthy et al., 2006).

3.) Les lymphocytes régulateurs

A ce jour, quatre sous-populations de LT CD4 régulateurs ont été décrites dans la littérature : Les nTreg (T régulateurs naturels), les iTreg (T régulateurs induits), les Tr1 et les Th3 (Figure 7). Ils participent à la tolérance immunitaire en régulant les LT effecteurs par leur action immunosuppressive. Ils sont essentiels pour le maintien de l'homéostasie car ils sont capables d'inhiber les réponses des LT effecteurs ou de provoquer leur apoptose par de nombreux mécanismes comme la production de molécules inhibitrices de l'activation des LT telle que la galectin-1 ou CTLA-4, la sécrétion de cytokines "suppressives" telles qu'IL-10 et TGF- β .

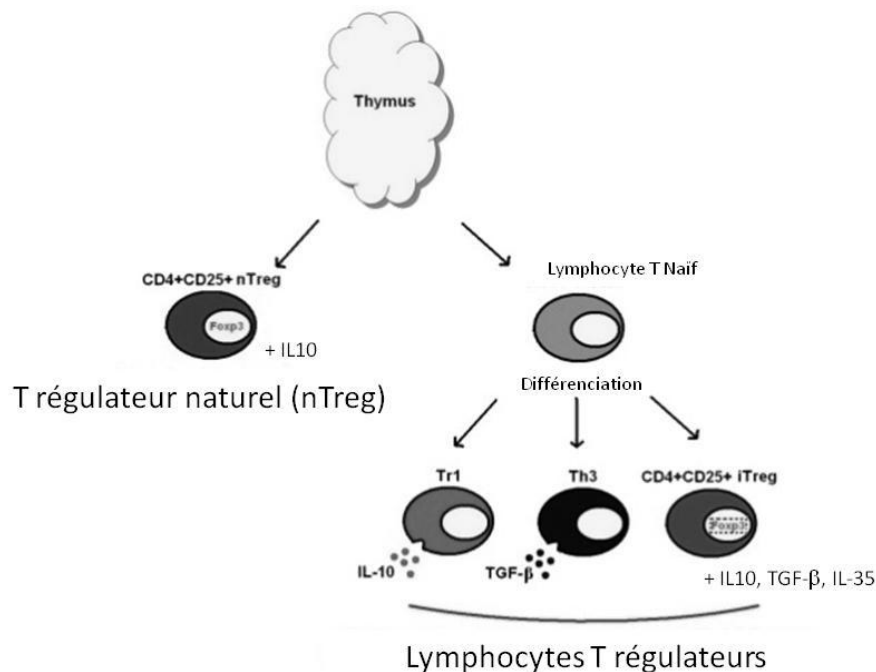


Figure 7 : Représentation schématique des 4 sous populations de T régulateurs

Les LT régulateurs sont une sous population de LT CD4⁺ ayant la propriété d'inhiber la prolifération d'autres LT effecteurs. Les lymphocytes régulateurs naturels sont directement issus du thymus, sont FoxP3⁺CD25⁺ et expriment de l'IL-10. Les autres sous-populations se différencient à partir de LT naïfs afin de former 3 sous-populations ; les Tr1 synthétisant l'IL-10, les Th3 synthétisant du TGF- β et des iTregs synthétisant de l'IL-10, du TGF- β et de l'IL-35.

Ainsi l'altération des fonctions des LT régulateurs pourrait jouer un rôle important dans les maladies auto-immunes inflammatoires. Dans la SEP, ces Tregs ont été décrits comme étant impliqués dans la physiopathologie de la maladie (Lowther and Hafler, 2012; Venken et al., 2010). Cependant, les travaux du laboratoire indiquent que la fréquence en périphérie et

leur fonction *in vitro* ne sont pas affectées chez les patients atteints de la SEP (Michel et al., 2008). A ce jour, le défaut fonctionnel des LT régulateurs dans la SEP reste toujours controversé même si de nouvelles perspectives portant sur une sous-population de LT CD8 ont été abordées, dont le phénotype CD122+ PD1+ chez la souris (Dai et al., 2010; Sinha et al., 2014) ou son équivalent humain CXCR3+ (Shi et al., 2009).

b.) La réponse innée

La SEP est une maladie neuroinflammatoire complexe impliquant des acteurs de la réponse adaptative et de la réponse innée. La réponse immunitaire innée implique la reconnaissance d'antigènes exogènes, via les TLRs, par les macrophages, les neutrophiles et les mastocytes. Leur recrutement et leur activation vont permettre la production de composés cytotoxiques tels que le lysozyme, la lactoferrine et l'oxyde nitrique. Le système inné permet aussi la reconnaissance de molécules dites du soi permettant de maintenir le système immunitaire dans un état quiescent. Le principal rôle de ce système est donc de protéger l'hôte et maintenir l'homéostasie. Cependant dans certaines maladies auto-immunes, le système immunitaire inné peut s'avérer très destructeur.

Les macrophages situés dans les lésions du SNC sont difficilement distinguables des cellules microgliales actives de part leur forme amiboïde et l'expression de leur marqueur antigénique qui sont les mêmes (Rawji and Yong, 2013). Lors de l'inflammation, les macrophages sont immédiatement activés (macrophages M1) et sécrètent des cytokines pro-inflammatoires et peuvent provoquer des lésions du SNC. Ensuite, ils perdent progressivement leur phénotype activé M1 pour passer au phénotype M2 qui produit des cytokines anti-inflammatoires stoppant l'inflammation et favorisant la réparation tissulaire. Le rôle des macrophages dans la physiopathologie de la SEP dans le modèle murin et chez les patients est donc très complexe. Les macrophages peuvent avoir un effet bénéfique dans la neuroprotection comme des effets délétères en activant le statut pro-inflammatoire dans les lésions. La balance entre le taux de macrophages M1 et M2 influe directement sur le processus physiopathologique de la maladie (Jiang et al., 2014).

D'autres cellules de l'immunité innée (mastocytes, cellules NK, lymphocytes $\gamma\tau$) ont été incriminées dans la physiopathologie de la SEP et font toujours l'objet d'études.

Les Toll-Like Récepteurs (TLR) ont aussi une place importante. Leur fonction première est de reconnaître des motifs moléculaires associés aux pathogènes (PAMP) afin de générer des signaux pro-inflammatoires et d'initier la réponse immunitaire adaptative. Une activation inappropriée des TLR peut favoriser le développement de maladies comme la SEP. La théorie de l'infection virale comme étant une des causes de la SEP peut être expliquée par ce mécanisme. En effet, un prétraitement à base de lysat bactérien permet d'aggraver la maladie dans le modèle EAE (Namer et al., 1994). Dans une autre étude sur l'EAE, la stimulation du TLR9 avec des oligonucléotides CpG peut stopper la tolérance et engendrer une réponse immunitaire contre le soi (Waldner et al., 2004).

IV. Les modèles de neuroinflammation auto-immune ou EAE

L'utilisation de modèles animaux pour étudier les mécanismes de la neuroinflammation est essentielle pour aborder les caractéristiques physiopathologiques, hétérogènes et complexes de la maladie au niveau du système nerveux central, et envisager de nouvelles cibles thérapeutiques. L'inoculation d'antigènes cérébraux dans des modèles expérimentaux permet d'induire un processus d'auto-immunisation produisant des lésions similaires à celles de la SEP. Ce modèle, l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE), est largement utilisé avec différentes variantes qui peuvent reproduire certaines caractéristiques de la maladie. La SEP étant elle-même une maladie hétérogène avec différents symptômes chez les patients constituant plusieurs formes de la SEP.

Le premier modèle expérimental remonte à la première moitié du 20ème siècle quand il a été observé que des injections répétées de broyat de cerveau humain ou ovin à des lapins pouvaient provoquer une encéphalite avec présence de leucocytes et une démyélinisation du SNC. Depuis 1942, l'utilisation de l'adjuvant complet de Freund a permis d'obtenir une EAE plus facilement et rapidement suite à une injection unique d'extrait de myéline ou d'antigènes définis. L'EAE peut être ainsi obtenue chez les primates (macaque, marmouset) et les rongeurs, la souris étant maintenant le modèle le plus couramment utilisé depuis le développement dans les années 80 de souches génétiquement modifiées (transgéniques ou déficientes pour un gène) qui permettent d'approfondir les mécanismes impliqués. Le développement de souris humanisées pour un type HLA particulier rend le modèle murin

encore plus intéressant pour reproduire une autoréactivité identique à celle retrouvée chez l'homme (Mangalam et al., 2004).

Chez la souris, l'EAE est largement utilisée pour les études sur la neuroinflammation auto-immune. Ce modèle est obtenu par immunisation avec des antigènes cérébraux (EAE active). Les antigènes utilisés pour induire l'EAE active sont principalement les peptides de protéines de la myéline, par exemple : la Glycoprotéine Oligodendrocytaire de la Myéline (MOG), le Protéolipide (PLP), ou la Protéine Basique de la Myéline (MBP). L'immunisation active induit une réaction auto-immune avec production de LT anti-myéline qui migrent dans le cerveau et la moelle épinière où ils sont réactivés et entraînent des lésions inflammatoires et démyélinisantes. Les lymphocytes "encéphalitogènes" issus de ces souris peuvent être isolés et mis en culture dans des conditions différentes de différenciation pour les réinjecter chez un animal naïf et induire une EAE "passive", montrant ainsi le pouvoir pathogénique de ces cellules.

Ces modèles reproduisent l'infiltration du SNC par les leucocytes, les LT autoréactifs étant les premiers à infiltrer le parenchyme nerveux, associés à des zones de démyélinisation. En fonction du type d'induction : actif, via l'injection de différents types d'antigènes cérébraux ou passif, via l'utilisation de clones T spécifiques (Ben-Nun and Cohen, 1981), en fonction de l'utilisation d'anticorps monoclonaux (Linnington et al., 1988) ou en fonction du profil génétique utilisé, différents phénotypes et mécanismes pathologiques peuvent être obtenus (Lassmann, 2007). Ainsi, aucun modèle EAE ne reflète entièrement le profil pathologique complexe de la SEP (Gold et al., 2006). Ils permettent donc d'appréhender séparément les différentes composantes de la physiopathologie de la maladie. Cette caractéristique de l'EAE est un avantage pour étudier plus finement certains mécanismes clés de la maladie.

Les symptômes de l'EAE classique sont une perte pondérale modérée associée à une paralysie progressive ascendante (de la queue jusqu'aux membres antérieurs). Le score moteur est établi classiquement selon une échelle de 0 à 5 correspondant aux différents stades de paralysie de l'animal (0 : aucun signe, 1 : flacidité de la queue, 2 : paralysie partielle des membres postérieurs, 3 : paralysie des membres postérieurs, 4 : paralysie des membres postérieurs et paralysie partielle des membres antérieurs, 5 : paralysie de tous les membres, état moribond). Dans le cas d'une EAE dite atypique, d'autres signes comme des signes

ataxiques peuvent être observés si le cervelet ou d'autres régions du cerveau sont sévèrement affectés.

C.) Modèle d'EAE dépendant d'une activation par les CMH de classe II

Le rôle des LT CD4 dans l'initiation et la gravité de la maladie a été clairement démontré au début des années 80 dans des modèles d'EAE passive suite à l'injection de LT CD4 autoréactifs (Ben-Nun and Cohen, 1981; Zamvil et al., 1985). De plus, des souris humanisées pour le gène HLA-DR-2 et pour le TCR spécifique anti-MBP 84-102 peuvent développer une EAE spontanée. Ce résultat montre que l'activation des LT CD4 exprimant un TCR humain permet de déclencher une inflammation dans le SNC semblable à la SEP (Madsen et al., 1999).

Les modèles actifs utilisant les peptides MOG 35-55 ou PLP139-151 injectés aux souris C57BL/6 ou SJL respectivement ont permis de renforcer les présomptions d'une implication préférentielle des LT CD4 anti-myéline dans la réponse immunitaire pathogénique de la maladie. L'analyse de ces modèles dépendant de la présentation par le CMHII a permis de mieux caractériser l'infiltrat inflammatoire. Il existe une infiltration dans le SNC de lymphocytes (majoritairement de type LT CD4 sécrétant de l'IFN γ pour les Th1 et de l'IL-17 pour les Th17), de macrophages, de granulocytes accompagnée d'une activation gliale (Höftberger et al., 2004). Cependant, le taux de démyélinisation et le profil de la maladie restent fortement variables en fonction de la souche génétique utilisée. En effet, le développement de la maladie chez les souris SJL provoque une EAE de forme récurrente-rémittente faiblement démyélinisante alors qu'une évolution de la maladie chez les souris C57BL/6 l'EAE est plutôt chronique, démyélinisante et présente une forte atteinte axonale. Enfin, il a été montré que le stress, les conditions d'hébergement et sanitaires ainsi que la quantité de peptide injecté peuvent modifier le développement de l'EAE (Mason, 1991; Miller et al., 2007).

D.) Modèle d'EAE dépendant d'une activation par les CMH de classe I

La mise en place de modèles mimant l'inflammation médiée par les LT CD8 a été plus tardive. En effet, il est plus difficile d'initier une réponse lymphocytaire T encéphalitogène

dépendante des molécules du CMH de classe I chez des animaux naïfs et d'obtenir des clones autoréactifs *in vitro*.

Dans les années 2000, deux équipes ont rapporté que le transfert passif de LT CD8 autoréactifs induisait une EAE permettant ainsi le développement d'une nouvelle voie de recherche du rôle des LT CD8 dans la physiopathologie de la SEP. D'autres travaux ont montré que les LT CD8 possédaient la fonctionnalité d'être directement cytotoxiques. En effet, les LT CD8 peuvent directement attaquer et détruire, *in vitro*, des axones ou des cellules neuroectodermes exprimant spécifiquement le CMH de classe I (Höftberger et al., 2004; Medana et al., 2001; Neumann et al., 2002).

Des souris délétées pour le gène b-2m (composant du CMH-I) ont été utilisées après immunisation active avec le peptide encéphalitogène MOG 35-55 (Linker et al., 2005). Les souris transgéniques immunisées développent une EAE plus forte associée à une importante perte axonale. Ces résultats suggèrent que les LT CD8 jouent aussi un rôle protecteur en particulier dans ce modèle. Cependant, ces résultats ont été controversés. Il a été montré que les molécules de classe I sont impliquées dans la régénération axonale (Oliveira et al., 2004) et que les souris déficientes en b-2m souffrent d'une mauvaise assimilation du fer provoquant ainsi de sérieux dommages au SNC (Rothenberg and Volland, 1996). Par conséquent, il est possible que l'article de Linker surévalue le rôle régulateur des LT CD8 dans leur modèle.

PARTIE 2 - INTERETS DES MODELES ANIMAUX

EAE CD8 DEPENDANT

I. Introduction

Comme nous l'avons déjà abordé, les LT CD8 prévalent (2 LT CD8 pour 1 LT CD4 environ) dans la plupart des lésions des patients atteints de la SEP (Babbe et al., 2000; Salou et al., 2013). De plus, des études ont montré que la déplétion spécifique des LT CD4 a moins de bénéfices (van Oosten et al., 1997; Racadot et al., 1993; Rumbach et al., 1996) que la déplétion de toute la population lymphocytaire grâce à l'anticorps anti-CD52 (Campath-1) chez les patients atteints de la SEP (Coles et al., 2006; Hirst et al., 2008).

La plupart des tests réalisés chez l'animal utilise les modèles murins classiques EAE qui dépendent essentiellement de la réponse LT CD4, c'est pourquoi un intérêt croissant se porte depuis quelques années sur le développement de modèles EAE dans lesquels la maladie serait initiée par des LT CD8 autoréactifs où la contribution des LT CD8 serait plus importante. Ceci permettrait de tester de nouvelles cibles thérapeutiques impliquant cette composante LT CD8 (Friese and Fugger, 2009).

A.) Les modèles d'EAE passive et active

Les premiers travaux ont commencé avec les recherches d'Huseby et coll. avec la souris C3H (mutation du TLR4 entraînant une modification de la réponse immunitaire) irradiée (Huseby et al., 2001) chez laquelle l'injection de LT CD8 autoréactifs envers une protéine de la myéline (MBP79-87) provoque des symptômes cliniques d'EAE et une inflammation localisée dans le cerveau avec une forte présence de neutrophiles relégués par des macrophages. La même année, Sun et al. montrent que le transfert adoptif de LT CD8 MOG 35-55 issus d'une souris malade provoquait une EAE chez des souris C57BL/6 et même chez des souris C57BL/6 RAG^{-/-} (dépourvues de lymphocytes) (Sun et al., 2001). Ces premiers modèles indiquant que les LT CD8 anti-myéline pouvaient être encéphalitogènes. L'injection de LT CD8 anti-MOG 35-55 dans des souris C57BL/6 permet de développer une EAE passive (Ford and Evavold, 2005) ; ces LT CD8 anti-MOG reconnaissent en fait un épitope particulier spécifique au sein de la séquence peptidique MOG 35-55: le peptide 37-46 qui est présenté à la surface des molécules de CMH de classe I activant spécifiquement les LT CD8 (Bettini et al., 2009a). Les souris immunisées avec cet épitope développent une EAE modérée (Bettini et al., 2009a). L'atteinte neuroanatomopathologique et la nature de l'infiltrat

n'ont pas été caractérisées dans ce modèle. Toutefois, des travaux plus récents n'ont pas confirmé ce rôle encéphalitogène des LT CD8 anti-MOG, attribuant au contraire un rôle régulateur envers les LT CD4 des LT CD8 (Jiang et al., 2003; York et al., 2010).

B.) Les modèles CD8 dépendant transgéniques

Pour mieux déterminer le rôle des LT CD8 dans la maladie, des modèles transgéniques ont été mis en place. Un premier modèle a été décrit par Na où des souris RAG^{-/-} exprimaient spécifiquement à la surface des oligodendrocytes l'antigène OVA (Na et al., 2008). Le but étant de déclencher une EAE grâce à l'injection de clones lymphocytaires LT CD8 OT-1 anti-OVA. Les travaux ont mis en évidence que, chez les souris adultes, les LT CD8 autoréactifs n'ont pas la possibilité de franchir la BHE; par contre une encéphalite léthale est obtenue lorsque ces lymphocytes sont injectés au cours des premiers jours post-nataux lorsque la BHE n'est pas entièrement mature. Cette encéphalite peut être neutralisée par un anticorps monoclonal bloquant la présentation du peptide OVA (Na et al., 2009).

Un autre modèle similaire a été développé combinant des souris MOG-HA (expression sélective de l'antigène hémagglutinine du virus Influenza sur les oligodendrocytes grâce à un promoteur de la MOG) et des souris exprimant un TCR transgénique exprimant le CMH de classe I reconnaissant spécifiquement le peptide HA512-520 (Saxena et al., 2008). Le croisement de ces deux souches de souris ne permet pas d'obtenir une EAE spontanée. Cependant, le transfert adoptif de clones CD8 Tc1 anti-HA512-520, préactivés *in vitro*, dans des souris MOG-HA induit des lésions inflammatoires dans la moelle épinière et les nerfs optiques associées à des troubles neurologiques. La caractérisation neuroanatomopathologique des lésions a montré une infiltration transitoire de LT CD8 et une démyélinisation, avec tout au moins dans le nerf optique une activation microgliale, une perte oligodendrocytaire et une atteinte axonale, semblables aux lésions actives retrouvées chez les patients atteints de la SEP. Les travaux sur ces modèles transgéniques montrent que les LT CD8 peuvent initier la maladie et avoir un rôle cytotoxique direct sur les oligodendrocytes présentant des antigènes à leur surface.

C.) Les modèles humanisés impliquant les LT CD8

Le développement de souris humanisées pour certains CMH a permis de mieux comprendre le rôle des LT CD8 dirigés contre des peptides de la myéline réactif chez l'homme (Fugger et al., 2009). Ainsi, un modèle murin a été mis en place en substituant le CMH de classe I murin par un HLA de classe I humain impliqué dans la SEP comme le HLA-A*0301 (Fogdell-Hahn et al., 2000). Un faible pourcentage des souris humanisées qui expriment aussi le TCR transgénique anti-PLP correspondant au HLA (2D1) isolé à partir des patients atteints de la SEP, développe une EAE spontanée léthale (Friese et al., 2008). L'immunisation avec le peptide PLP (épitope pour les LT CD4) augmente l'incidence de la maladie à plus de 70%. Or, il a été montré que même si la première phase de la maladie est initiée par les LT CD8 anti-PLP, il existe une seconde phase de la maladie où les LT CD4 anti-MOG prennent le relai grâce au phénomène d'« épitope spreading ». Ce phénomène est également décrit dans un autre modèle transgénique où l'activation de LT CD8 autoréactifs envers le HLA-A2 (HLA-A*0201) transgénique permettrait d'étendre la reconnaissance antigénique en libérant de nouveaux épitopes autoantigéniques afin de provoquer l'activation de LT CD4 anti-MOG perpétuant ainsi l'EAE (Mars et al., 2007).

D.) Le modèle viral TMEV

Le modèle viral induit par le virus Theiler (appartenant à la famille des picornavirus, notamment responsable de l'induction de la poliomyélite chez l'humain) est utilisé depuis longtemps comme modèle d'inflammation démyélinisante (Lipton, 1975). Chez les souris SJL, l'injection intracérébrale du virus Theiler induit une maladie neurologique qui évolue en deux phases : une encéphalite, suivie par une inflammation de la substance blanche du cerveau et par une démyélinisation des neurones du SNC. Dans la première phase, le virus infecte surtout les neurones, mais au cours de la deuxième phase, on retrouve surtout le virus dans les macrophages et dans les cellules gliales. La réponse immunitaire, initialement dirigée contre les antigènes viraux, est essentiellement réalisée par les LT CD8 qui éliminent l'infection en induisant la mort des neurones. Dans la seconde phase, la réaction immunitaire est dirigée contre des peptides de myéline et les cellules sont des LT CD4 (Dal Canto MC et al., 1996). Les souris ainsi infectées développent une maladie similaire à la forme rémittente récurrente, avec des poussées correspondant à un changement de cible antigénique. Ce

modèle viral ne peut être induit dans les souris C57BL/6. En effet, 3 semaines après l'infection le virus est éliminé grâce à une forte réponse LT CD8 (Lyman et al., 2004).

II. Evaluation de 2 modèles EAE LT CD8 dépendant

La recherche sur la sclérose en plaques a longtemps été focalisée sur le rôle pathogénique des LT CD4. Cependant, de nombreux arguments cités précédemment sont en faveur d'une implication des LT CD8 qui auraient un rôle important en tant qu'effecteurs dans la SEP.

Hormis le modèle viral où l'on retrouve de nombreux LT CD8 dans le parenchyme nerveux (Kang et al., 2002), il n'existe pas, à ce jour, de modèle EAE active ou passive dans lequel on retrouve une majorité de LT CD8 encéphalitogènes dirigés contre un antigène du SNC. L'obtention d'une EAE après transfert d'un nombre élevé de cellules LT CD8 anti-MOG pourrait être liée à la présence résiduelle de 5 à 10% de LT CD4 dans la préparation de LT injectée. Dans le modèle récent d'EAE active induite par la MOG 37-46 (Bettini et al., 2009a), les souris développent une EAE classique avec un score clinique relativement faible, mais la présence et la composition de l'infiltrat T n'étaient pas connues. Disposer d'un modèle EAE facile à mettre en place et impliquant de façon prépondérante les LT CD8 est important pour les raisons évoquées précédemment quant à l'étude de cette composante dans la SEP et des molécules impliquées à cibler pour de nouvelles thérapies. Une partie de mon travail de thèse a donc été d'évaluer ce modèle CD8 (MOG 37-46) dépendant, de le caractériser au niveau neuroanatomopathologique et éventuellement de l'améliorer. J'ai également évalué un nouveau modèle transgénique LT CD8 dirigés contre les oligodendrocytes décrit par Saxena (Saxena et al., 2008).

A.) Le modèle MOG 37-46

Bettini a décrit un modèle d'immunisation active avec le peptide MOG 37-46 reconnu essentiellement par le CMH-I permettant d'obtenir une EAE ascendante (classique), la sévérité de la maladie étant moins forte que celle obtenue avec le modèle classique MOG 35-55 (Bettini et al., 2009a). Cependant, la description neuroanatomopathologique des lésions

obtenues n'a pas été réalisée. Notre objectif a donc été de caractériser les lésions du SNC dans ce modèle et de l'évaluer en tant que modèle "T CD8".

a.) Matériels et méthodes

1.) Induction de l'EAE

Toutes les expérimentations animales réalisées sont conformes aux recommandations de l'Union Européenne pour les soins et l'utilisation des animaux dans un protocole de recherche. Les souris C57BL/6 (Janvier Labs, Le Genest Saint-Isle, France) sont hébergées dans des cages dans une pièce où la température, l'humidité et la lumière sont contrôlées. Les animaux ont libre accès à l'eau et à la nourriture (alimentation standard RM01, Special Diet Services, Witham, Essex, United Kingdom). Les souris sont acclimatées une semaine avant d'intégrer les protocoles à l'âge de 6 semaines.

Avant chaque protocole, les souris C57BL/6 sont anesthésiées avec un mélange kétamine (1,5 mg)/xylazine (0,1 mg). Les souris sont ensuite immunisées en sous-cutané (s.c) avec une émulsion contenant le peptide MOG 37-46 (200 µg) avec de l'adjuvant complet de Freund (CFA) supplémenté de *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (MT, 3 mg/ml). Les souris témoins ont reçu une émulsion composée de PBS et d'adjuvant (CFA/MT). La toxine pertussique (PTX, 300 ng) est administrée, en intra-péritonéal (i. p), à 0 et 48 heures de l'immunisation. Le poids des animaux est suivi tous les jours. En parallèle, l'évaluation de la sévérité de la maladie est réalisée selon l'échelle de l'EAE classique ascendante (tableau A)

Score	Symptômes
0	absence de signe clinique
1	perte tonicité de la queue
2	parésie légère (1 patte)
3	parésie sévère (2 pattes)
4	Paraplégie
5	Moribonde. Euthanasie

Tableau A : Classification du score clinique en fonction des symptômes

Nous avons utilisé une échelle de score allant de 0 à 5 détaillant l'évolution de la maladie. 0 étant attribué aux animaux n'ayant aucun symptôme, 1 lorsqu'un fléchissement de la queue est observé, 2 lorsqu'une des pattes de l'animal est paralysée, 3 lorsque les pattes antérieures sont atteintes, 4 lorsque l'animal est paraplégique et 5 lorsque l'animal est dans un état moribond. La charte d'éthique préconise une euthanasie après 1 journée de score 4.

2.) Sacrifice des souris, collecte des tissus d'intérêt

Après une anesthésie létale au thiopental (10 mg i.p.), l'oreillette droite du cœur des souris est percée et 20ml d'HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) sont perfusé dans le ventricule gauche. Les tissus d'intérêts sont ensuite prélevés (rate, moelle épinière, cerveau, nerf optique) et conservés dans du milieu HBSS à 4°C avant d'être utilisés ou bien congelés et conservés à -80°C.

3.) Extraction des splénocytes totaux

La rate est perfusée avec de la collagénase D (10mg/ml) et dilacérée durant 30 minutes à 37°C. La suspension cellulaire obtenue est filtrée via un filtre de 100µm avant d'être reprise dans une solution de lyse des globules rouges durant 5 minutes (NH₄Cl 8,29 g/l ; KHCO₃ 1g/l ; Na₂EDTA 37,2 mg/l à pH 7,2). Le lysat cellulaire est ensuite lavé avec du HBSS et filtré sur un filtre 70 µm. Les splénocytes sont ensuite repris dans du HBSS et dénombrés sur cellule de Malassez.

4.) Isolation des LT

Les LT sont extraits à partir des splénocytes totaux grâce au kit d'isolation Pan T cell Isolation II (130-095-130, Miltenyi). Le principe du test repose sur un tri négatif des LT grâce à un marquage biotynilé des marqueurs suivants : CD11b, CD11c, CD19, CD45R, CD49b, CD105, CMHII et Ter-119. Les cellules biotynilées sont ensuite marquées avec un anticorps magnétique anti-biotine favorisant le tri négatif de la population de LT grâce à une colonne aimantée.

5.) Culture cellulaire et test de prolifération in vitro

Avant, la mise en culture, les cellules sont marquées durant 10 minutes avec un marqueur de prolifération DDAO (CellTrace™ Far Red DDAO-SE, Invitrogen C34553, 2mM). Le principe de ce fluorochrome (émission en rouge profond) est le suivant : il va créer des liaisons covalentes entre le groupe actif -SE et les amines primaires des protéines à l'intérieur et à l'extérieur des cellules. Cela permet un marquage de la population cellulaire totale de départ. Lorsque les cellules prolifèrent, l'intensité de fluorescence diminue à chaque division.

Les lymphocytes sont ensuite lavés deux fois pour enlever l'excédant de marqueur DDAO et repris dans du milieu RPMI complet (RPMI 1640, Gibco ; SVF 10% ; Sodium pyruvate 1mM ; Acides aminés non essentiels 1% ; Tampon Hepes 5mM ; Pénicilline 100U/ml ; streptomycine 0,1mg/ml ; L-glutamine : 2mM ; β -mercaptoéthanol $5 \cdot 10^{-5}$ M). Les cellules marquées sont disposées dans des plaques à fond en U en présence de splénocytes totaux ($2 \cdot 10^5$ cellules/puits ; [T/splénocytes : 1/5]) et stimulées ou non durant 3 jours avec 10 μ M de peptide 37-46 (VGWYRSPFSR, référence 221712, Gene Cust) ou avec 10 μ M de peptide 35-55 (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, référence 51716, Gene Cust).

Afin de visualiser la prolifération des LT en cytométrie de flux, les cellules ont été marquées avec les anticorps suivants : anti-CD3 FITC (BD 553062, Biosciences), anti-CD8 PE (BD 553033, Biosciences) et anti-CD4 PeCy7 (BD 522775, Biosciences) et du DAPI (marqueur de viabilité). La lecture de la fluorescence est réalisée sur les cytomètres BD LSR II ou Canto, les résultats sont analysés sur les logiciels DIVA et FlowJo.

6.) Coupe au cryostat et Immunohistochimie (IHC)

Des coupes de tissus congelés de 12µm sont effectuées grâce à un cryostat (Leica CM3050S) sur des lames SuperFrost (Thermo scientific). Les coupes sont fixées 10 minutes à température ambiante à l'éthanol 100% avant marquage. Le marquage FoxP3 nécessite une fixation au paraformaldéhyde (PFA) 2% durant 10 minutes favorisant les marquages intra-nucléaires. Les coupes sont pré-incubées avec une solution PBS contenant 30% de NDS (Normal Donkey Serum), et 0,5% de Triton-X pendant 20 minutes puis incubées avec les anticorps primaires (tableau B) dans une solution PBS contenant 3% de NDS et 0,05% de Triton-X durant une nuit à 4°C. Après deux lavages au PBS de 10 minutes, les coupes sont incubées avec les anticorps secondaires (tableau B) dans du PBS, 3% NDS, 0,05% Triton-X. Enfin, les coupes sont marquées au DAPI afin de marquer les noyaux des cellules.

	Anticorps	Espèce-Hôte	Référence	Fournisseur	Concentration IHC classique
Anticorps primaires	CD3	Rat	BD 550275	Biosciences	1/200
	CD3	Chèvre	Sc-1127	Santa Cruz	1/200
	CD4	Rat	BD 550278	Biosciences	1/200
	CD8	Rat	BD 550281	Biosciences	1/200
	GFAP	Lapin	Z_0334	Dako	1/2000
	FoxP3	Rat	12-5773-80	Ebiosciences	1/200
	OX40(CD134)	Rat	BD 562181	Biosciences	1/100
	Nogo A	Lapin	pab80672	Covalab	1/100
Anticorps secondaires	IgG lapin DL 488	Âne	711-486-152	Jackson Immuno Research	1/800
	IgG chèvre DL-549	Âne	705-506-147	Jackson Immuno Research	1/800
	IgG Rat DL-594	Âne	712-516-153	Jackson Immuno Research	1/800

Tableau B : Liste des anticorps utilisés en IHC classique

Un marquage complémentaire de la myéline au noir de Soudan (0,1% dans l'éthanol 70%) est réalisé ensuite durant 15 minutes suivi de 3 lavages au PBS afin d'observer de potentielles zones de démyélinisation (zones non marquées au noir de Soudan).

b.) Résultats

1.) Induction expérimentale du modèle MOG 37-46

Dans un premier temps, des souris femelles C57BL/6 ont été immunisées avec le peptide MOG 37-46 à J0 et deux injections i.p. de toxine pertussique (PTX) à J0 et J+2. Le suivi pondéral journalier pendant 30 jours n'a montré aucune chute de poids. De plus, les souris ne présentaient aucun signe clinique de déclenchement de l'EAE.

Par conséquent, une autre technique d'immunisation a été testée sur un nouveau groupe de souris, en boostant le système immunitaire des souris avec une seconde injection du peptide 37-46 à J+7 accompagnée d'une injection i.p. de PTX (J+7 et J+9). Le suivi pondéral sur un mois n'a pas permis d'observer une chute de poids et les souris n'ont pas déclaré de symptômes de l'EAE.

Suite à ces résultats, le protocole d'immunisation a été modifié en supprimant l'ajout de PTX qui accompagne la seconde immunisation. En effet, bien que l'ajout de PTX favorise la réponse immunitaire en déplaçant notamment les Tregs de la rate (Cassan et al., 2006), la PTX peut inhiber la migration des LT dans l'organe cible (Su et al., 2001) qui a lieu entre le 6^{ème} et 9^{ème} jour dans le modèle d'EAE. Ainsi, les souris vont développer une EAE ++++

mais la réponse a été plus tardive (>20 jours) que pour le modèle EAE classique (15 jours) ou bien que pour le modèle MOG 37-46 décrit précédemment par Bettini (11 jours ; (Bettini et al., 2009a). De plus, toutes les souris ne développent pas l'EAE avec ce protocole d'immunisation, l'incidence est d'environ 30% (10 souris EAE sur 30 souris immunisées), contrairement au taux d'incidence obtenu avec le modèle classique MOG 35-55 qui est de 100% (Figure 8).

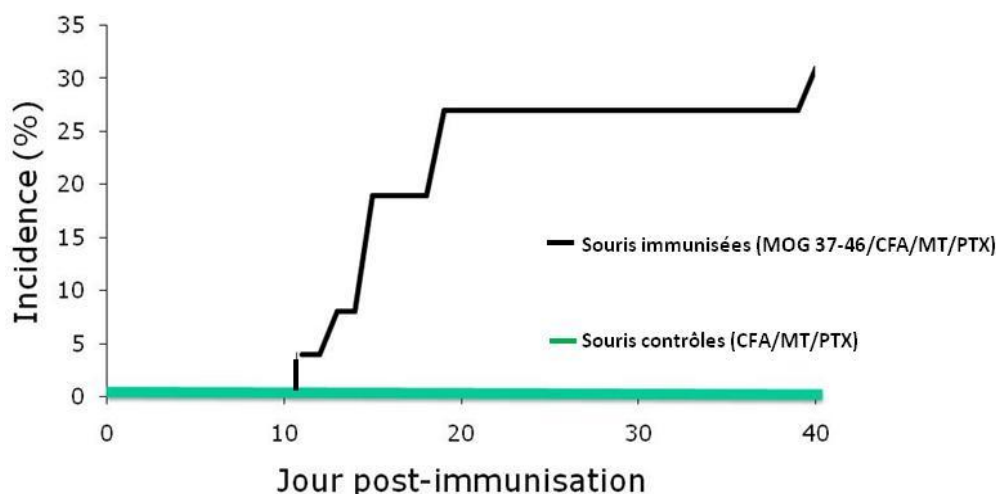


Figure 8 : Incidence de la maladie après immunisation avec les peptides MOG 37-46

Les souris ont été immunisées avec une émulsion de 200 μ g de peptide MOG 37-46 et d'adjuvant complet de Freund (CFA) complété avec du *Mycobacterium Tuberculosis* (MT). Les souris ont reçu ensuite deux injections de PTX. En parallèle, des souris contrôles ont été immunisées avec la même émulsion de CFA/MT sans peptide. Sur les trente souris immunisées, 10 ont présenté au minimum un fléchissement de la queue (critère d'initiation de la maladie) entre 11 et 38 jours.

2.) Analyse cytométrique des splénocytes

Malgré l'absence de symptômes de l'EAE chez certaines des souris, la réactivité des lymphocytes spléniques a été évaluée en cytométrie de flux pour savoir si une autoréactivité contre la MOG 37-46 s'est développée. Après sacrifice de la souris, les splénocytes ont été récoltés et incubés avec le peptide pendant 3 à 4 jours.

→ Autoréactivité anti-MOG 37-46 chez les souris n'ayant pas développé l'EAE

Le taux de lymphocytes DDAO+ en condition basale, issus de souris contrôles, est utilisé comme valeur seuil pour calculer le pourcentage de LT qui prolifère spécifiquement après stimulation. Pour les souris non immunisées avec la MOG 37-46 (ayant reçues l'émulsion de CFA/PBS), les résultats montrent qu'après 3 jours de culture, le taux de LT CD8 qui ont proliféré, en réponse au peptide, est très faible (<3%). Nous avons alors évalué le taux de LT CD8 répondant au peptide MOG 37-46 à partir des splénocytes issus d'une souris EAE (immunisée avec l'émulsion CFA/PBS/peptide 37-46). La diminution d'environ

10% du nombre de LT CD8 DDAO+, en présence du peptide MOG 37-46, indique une prolifération des LT CD8 issus de la souris immunisée par l'émulsion peptidique MOG 37-46 (Figure 9, carré rouge).

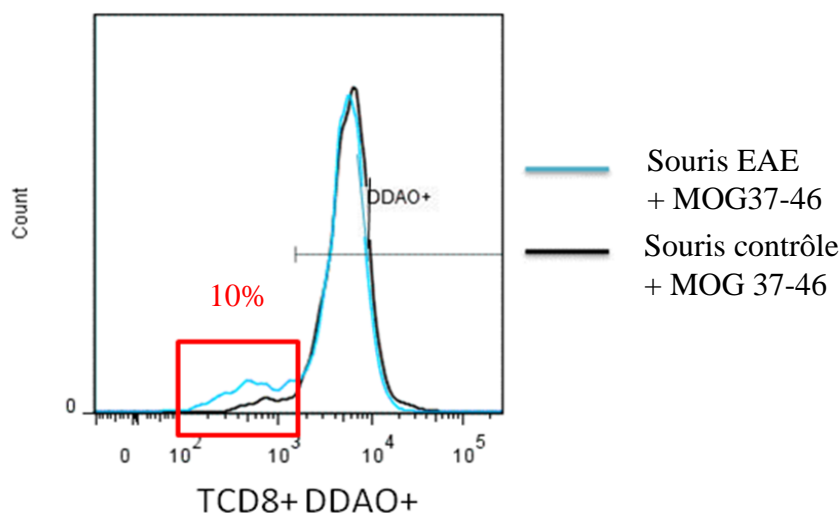


Figure 9 : Exemple d'histogramme obtenu après analyse cytométrique de la prolifération des lymphocytes T CD8+ avec le peptide MOG 37-46

Après stimulation *in vitro* (ou non) par le peptide MOG 37-46 (10 μ M) pendant 3 jours, un test de prolifération des lymphocytes spléniques LT CD8, marqués au DDAO, a été effectué. Les résultats sont obtenus à partir des cellules vivantes DAPI- CD3+ CD8+. Les histogrammes montrent une différence de 10% (encadré rouge) entre la prolifération basale des LT CD8 (courbe noire) et la prolifération antigène spécifique des LT CD8 activés par le peptide (courbe bleue).

Ces résultats montrent qu'il existe bien une autoréactivité des LT CD8 même chez les souris n'ayant pas développé d'EAE. L'activation "non spécifique" des lymphocytes grâce à l'anticorps anti-CD3 confirme que les LT testés ont la capacité de proliférer. Cependant, seuls les lymphocytes issus d'une souris immunisée avec le peptide MOG 37-46 présentent une autoréactivité anti-MOG 37-46 significative envers ce peptide (Figure 10).

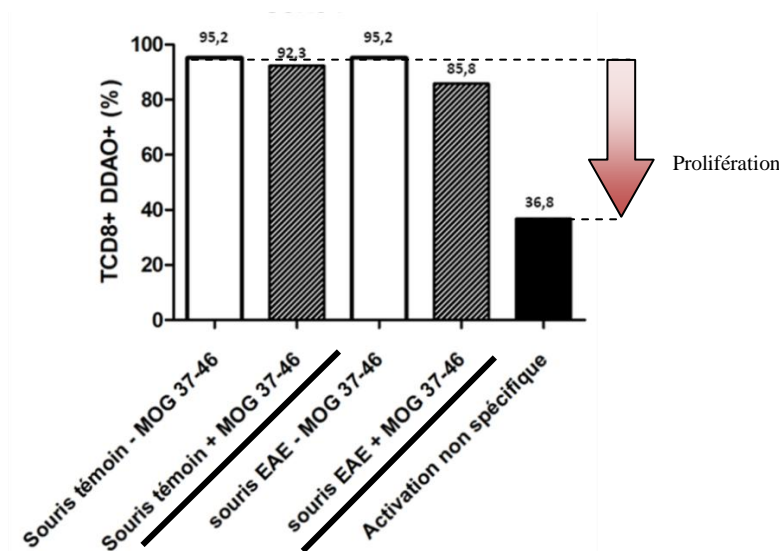


Figure 10 : Exemples de réponse proliférative de la fraction LT CD8 des splénocytes chez les souris témoins ou immunisées par le peptide MOG 37-46.

Après stimulation *in vitro* par le peptide MOG 37-46 (10 μ M), un test de prolifération des lymphocytes spléniques LT CD8, marqués au DDAO, a été effectué. L'index de prolifération des lymphocytes a été évalué grâce au marquage DDAO en cytométrie de flux. Les cellules DDAO "négatives" (dont l'intensité du marquage DDAO est inférieure au seuil initial) sont les cellules ayant proliféré.

→ **Autoréactivité anti-MOG lors de l'apparition des premiers symptômes de l'EAE (score 1)**

Différentes stimulations peptidiques ont été testées, soit avec la MOG 35-55 pour mettre en évidence un éventuel phénomène d' « épitope spreading » et une réponse LT CD4, soit avec la MOG 37-46, soit avec les deux peptides simultanément pour observer les interactions éventuelles entre les LT CD4 et les LT CD8. Après stimulation non spécifique avec l'anticorps anti-CD3, les résultats montrent que les LT ont conservé leur capacité à proliférer. Comme observé précédemment, les LT CD8 prolifèrent en présence du peptide MOG 37-46. Cependant la stimulation simultanée avec les peptides MOG 37-46 et MOG 35-55 accentue la prolifération des LT CD8 (Figure 11). Il est probable que les LT CD4 présents lors de l'amplification libèrent de l'IL-2, suite à leur activation par le peptide MOG 35-55, qui va amplifier la réponse CD8.

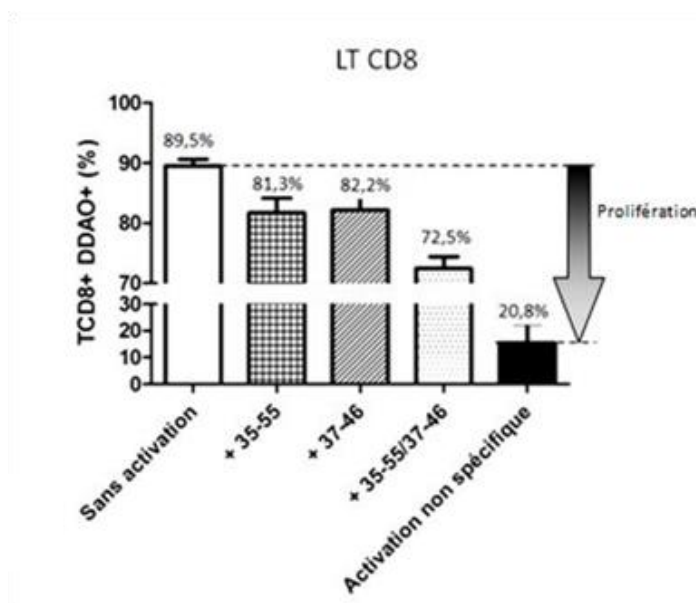


Figure 11 : Réponse proliférative des LT CD8 dans les cultures de splénocytes aux peptides de la MOG

Les lymphocytes spléniques d'une souris immunisée avec le peptide 37-46 ont été stimulés soit par le peptide MOG 35-55 (10 μ M), soit par le peptide 37-46 (10 μ M) ou soit par les deux peptides simultanément (10 μ M MOG 35-55 + 10 μ M MOG 37-46, pointillé) pendant 3 jours (ou sans stimulation, barre blanche). Une activation "non spécifique" avec l'anticorps anti-CD3 sert de témoin positif de prolifération pour toute la population LT CD8 (barre noire). A) analyse cytométrique des LT CD8..

Le bilan des tests de prolifération des différentes souris immunisées avec la MOG 37-46 indique qu'une auto-réactivité LT CD8 anti-MOG 37-46 s'est bien développée (DDAO" négatives"= 5,8 % \pm 1,8 n=5).

3.) Analyse Immunohistochimique

→ Caractérisation de l'infiltrat dans le modèle EAE MOG 37-46

Nous avons effectué un marquage GFAP/CD4 et GFAP/CD8 sur des coupes de moelle épinière (Figure 12 A) et de cervelet (Figure 12 B), issues de souris EAE sacrifiées 6 jours après l'apparition des premiers symptômes (score 1 au moment du sacrifice effectué). Les LT CD4 (Figure 12 E) sont retrouvés en très grand nombre (\sim 50 LT CD4/mm² dans les zones infiltrées) dans les différents segments de la moelle épinière (sacrée, lombaire, thoracique et même cervicale) alors que les LT CD8 (Figure 12 C) sont retrouvés en plus faible quantité (\sim 2 LT CD8/mm² dans les zones infiltrées) dans ces quatre segments de

moelle épinière. Nous observons aussi une infiltration de LT CD4 (Figure 12 F) et LT CD8 (Figure 12 D) dans la substance blanche du cervelet avec une proportion équivalente de LT CD4 et de LT CD8.

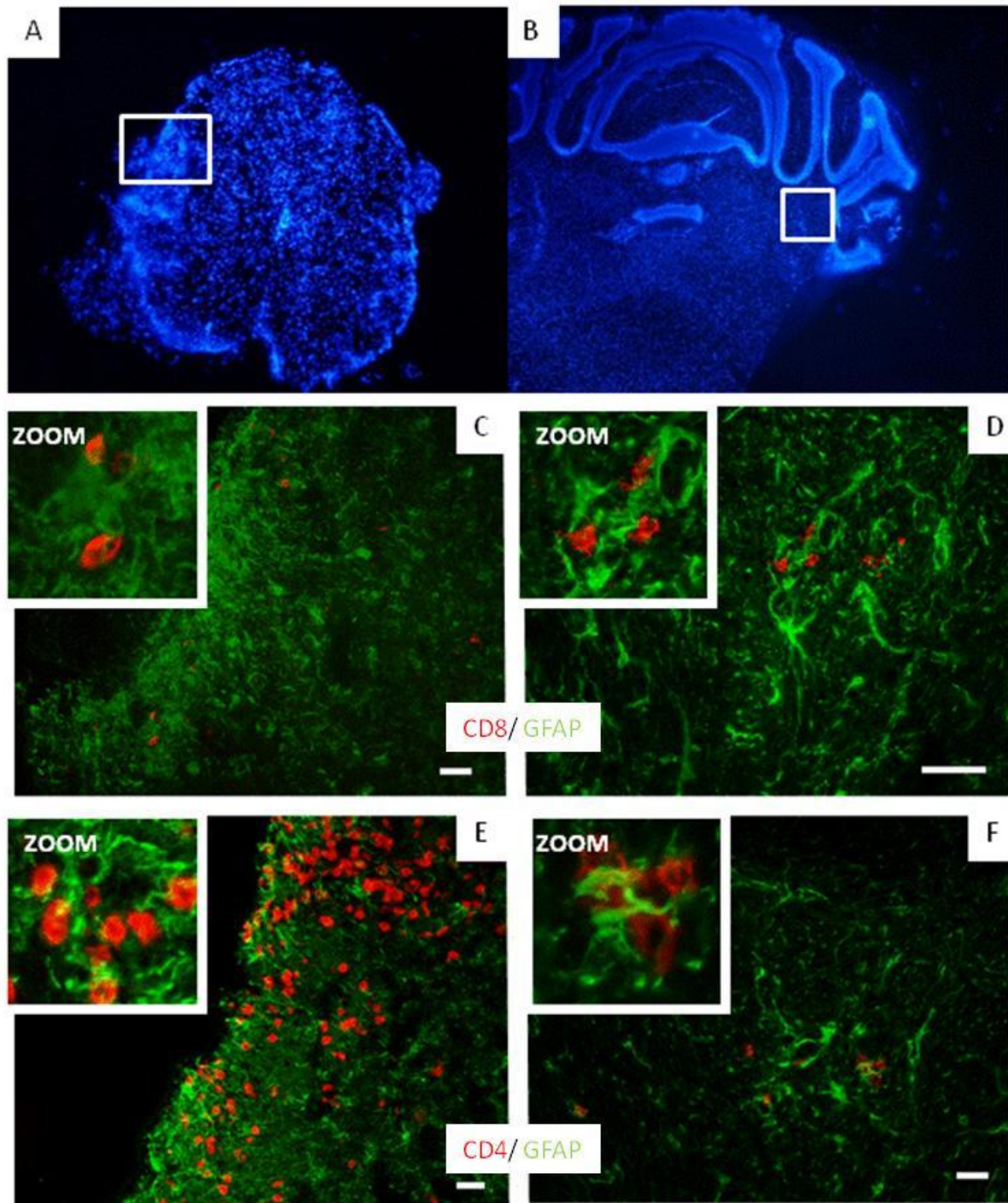


Figure 12 : Exemples d'infiltrats lymphocytaires dans la moelle épinière et le cervelet d'une souris malade immunisée par la MOG 37-46

Microscopie à fluorescence réalisée sur des coupes de 12 μm d'une moelle épinière sacrale et du cervelet de souris immunisée par la MOG 37-46 (objectif X 20). Localisation d'un infiltrat cellulaire visualisé par la densité des noyaux marqués par le DAPI (bleu) dans la moelle épinière sacrale (A) et dans le cervelet (B). Visualisation dans ces infiltrats des astrocytes marqués avec l'anti-GFAP (vert) et des LT CD8 (rouge, C et D) ou LT CD4 (rouge, E et F) à l'objectif X40. Les encarts (zoom) montrent ces lymphocytes à proximité des astrocytes (objectif X62). Barre d'échelle : 20 μm .

Les nerfs optiques sont également atteints par l'invasion lymphocytaire (environ 10 lymphocytes CD4 ou CD8 par coupe de nerf optique de 12 μ m, Figure 13).

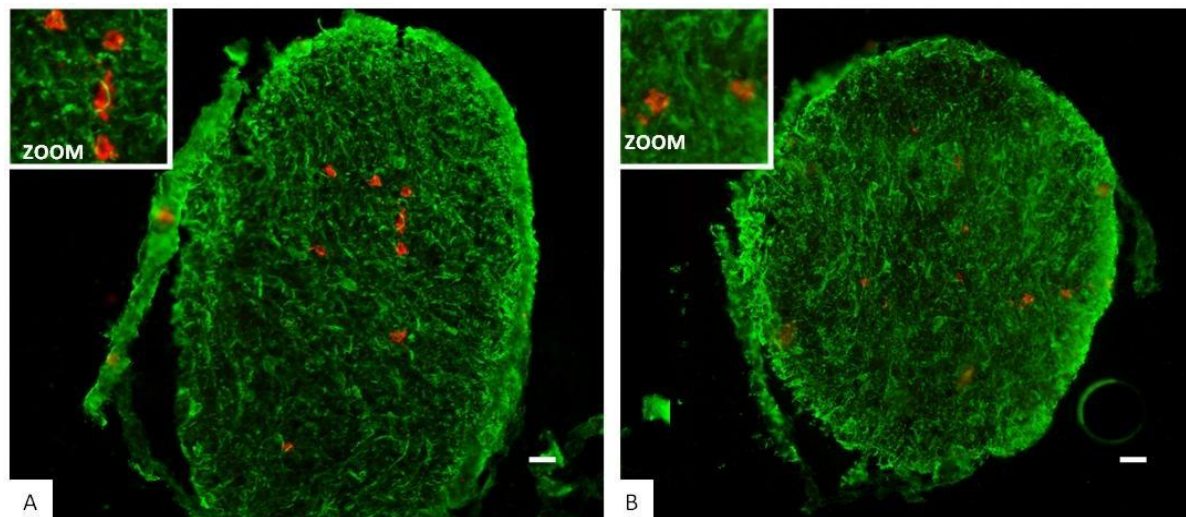


Figure 13 : Infiltrat lymphocytaire LT CD4 et LT CD8 dans le nerf optique d'une souris immunisée par la MOG 37-46

Microscopie à fluorescence réalisée sur des coupes de 12 μ m de nerf optique provenant de souris immunisée par la MOG 37-46 (objectif X 20). Visualisation d'un infiltrat lymphocytaire LT CD4 (rouge, A) et LT CD8 (rouge, B) dans le nerf optique de la souris visible grâce au marquage glial GFAP (vert). Encarts : Agrandissements de la zone infiltrée. Barre d'échelle : 20 μ m.

Grâce au marquage noir de Soudan, des zones de démyélinisation, entourées en rouge (Figure 14) sont visibles au niveau de la substance blanche de la moelle épinière. Le noir de Soudan marquant la myéline, les zones d'éclaircissement correspondent à une démyélinisation locale. Par conséquent, on peut dire que l'immunisation par la MOG 37-46 peut déclencher une encéphalomyélite.

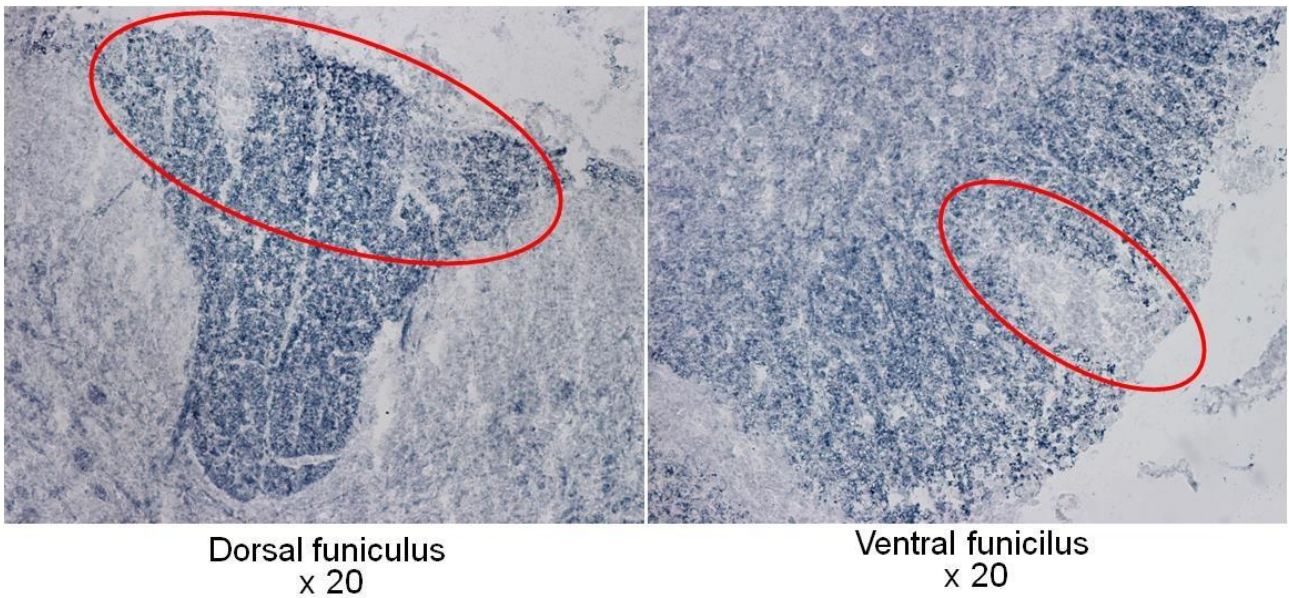


Figure 14 : Exemple de démyélinisation chez une souris malade immunisée par la MOG 37-46

Microscopie optique réalisée sur des coupes de 12 μ m de moelle épinière provenant de souris immunisées par la MOG37-46 (objectif X 20). Après marquage au Noir de Soudan (marqueur de la myéline), des zones de démyélinisation sont observées au niveau de la substance blanche au niveau du cordon dorsal (dorsal funiculus) et du cordon ventral (ventral funiculus).

→ **Caractérisation de la nature des lymphocytes infiltrants**

Afin de mieux comprendre la nature des LT infiltrants, des marquages supplémentaires ont été effectués. En effet, les cellules T infiltrées sont relativement nombreuses dans la moelle épinière en comparaison du score clinique modeste de ces souris, laissant présager la présence de nombreux LT régulateurs. Malgré un marquage FoxP3 mis au point sur la rate (Figure 15 B) pour identifier la sous-population régulatrice Treg FoxP3+, aucun lymphocyte régulateur de ce type n'a été retrouvé dans les différentes lésions. Au contraire, la majorité des LT présente un phénotype activé OX 40+ (Figure 15 A). En effet, le marquage spécifique pour le marqueur OX40 montre que 80% des LT sont activés. Ces résultats révèlent que les cellules T infiltrantes possèdent majoritairement un phénotype activé.

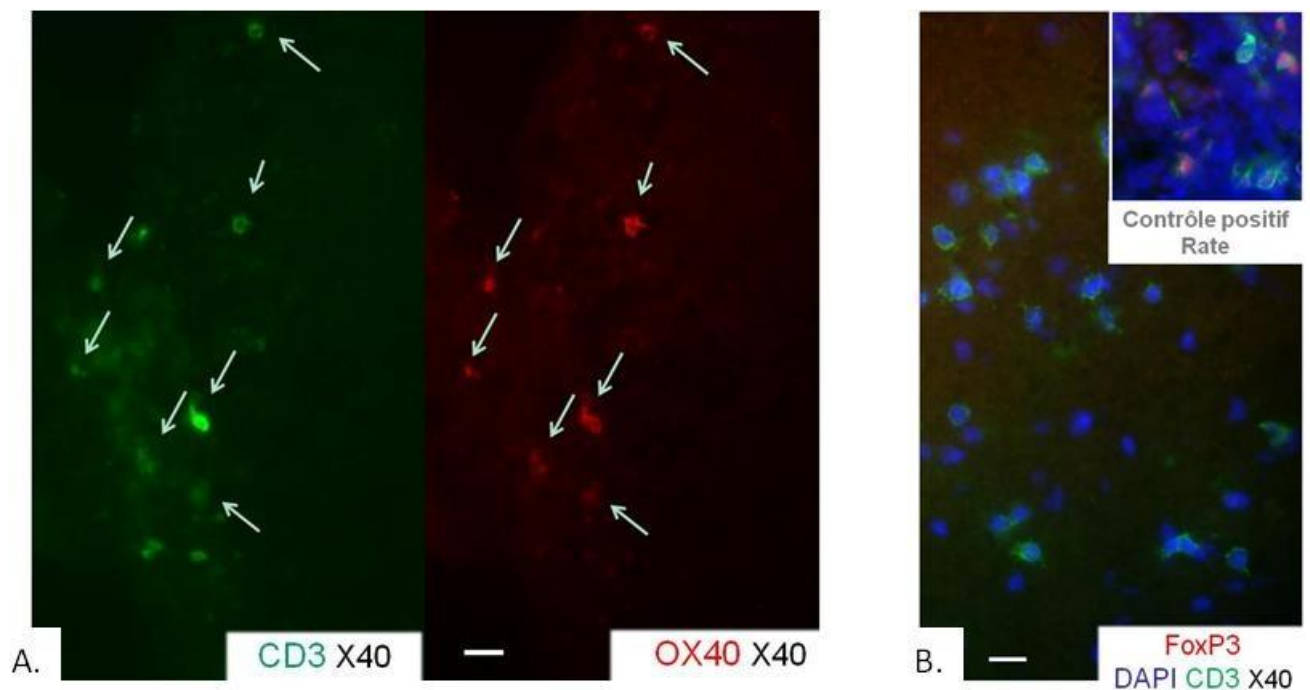


Figure 15 : Présence de LT activés (OX40+) non-régulateurs (FoxP3-) dans le SNC des souris immunisées MOG 37-46

Microscopie à fluorescence réalisée sur des coupes de 12 μm d'une moelle de souris immunisée par la MOG 37-46 (objectif X 40). La caractérisation de l'infiltrat cellulaire montre des cellules T CD3+ ayant un profil activé grâce à la colocalisation des cellules CD3+ (en vert) et des cellules OX40, en rouge) (A). Les flèches blanches indiquent des cellules doublement marquées CD3+/OX40+. De plus, la recherche de cellules CD3+ (en vert) FoxP3+(en rouge) négative atteste que les cellules n'ont pas ce profil régulateur (B). Encart: marquage intra-cellulaire de FoxP3 sur coupe de rate. Barre d'échelle : 20 μm .

c.) Discussion

Nous avons réalisé une immunisation des souris avec la MOG 37-46 afin de reproduire le modèle d'EAE LT CD8 dépendant décrit par Bettini et al (2009). Différents protocoles d'immunisation ont été testés : le premier comportant une injection du peptide et les deux suivants comportant une injection et un rappel avec le peptide. Bien que le protocole avec une seule immunisation permet d'induire une EAE avec le modèle MOG 35-55 (100% des souris), une deuxième immunisation sans toxine pertussique s'avère nécessaire pour obtenir une EAE (avec 30% d'incidence) avec la MOG 37-46. La PTX est utilisée couramment comme adjuvant dans l'EAE (Brabb et al., 1997). Son action est non seulement de favoriser la perméabilité de la barrière hémato-encéphalique, mais aussi d'agir sur les cellules immunitaires via les Toll Like Receptor 4 (TLR4) (Kerfoot et al., 2004), notamment en déplaçant la rate de leurs Tregs (Cassan et al., 2006). Toutefois, les travaux de Su et coll. indiquent que la PTX inhibe la migration des LT vers les organes cibles. Or, l'infiltration des premières cellules T dans le SNC avec les modèles d'EAE active se situe entre le 6^{ème} et le 9^{ème} jour, ce qui expliquerait pourquoi la PTX ne doit pas être administrée lors du second rappel au 7^e jour.

Malgré l'absence de symptôme de l'EAE chez certaines souris immunisées, l'analyse cytométrique des splénocytes après re-stimulation *in vitro* avec le peptide MOG 37-46 montre qu'il existe une autoréactivité des LT CD8 envers le peptide 37-46, en accord avec (Bettini et al., 2009). *In vitro*, la stimulation simultanée des splénocytes avec le peptide MOG 35-55 et MOG 37-46 induit une plus forte proportion de LT CD8 qu'en présence du peptide MOG 37-46 seul. Ces données suggèrent qu'un phénomène d'« épitope spreading » peut se développer chez la souris EAE initialement immunisée avec la MOG 37-46 conduisant à l'émergence de LT autoréactifs pour d'autres épitopes de la myéline notamment de la MOG 35-55, le peptide MOG 37-46 étant clairement trop court pour être présenté par le CMH-II et activer les LT CD4 (Bettini et al., 2009b). De plus, ces LT CD4 activés par la MOG par la sécrétion d'une interleukine comme l'IL-2 pourraient favoriser la prolifération des LT CD8 dans notre test *in vitro*. Malgré la présence de LT CD4 présentant un phénotype activé dans le SNC des souris EAE MOG 37-46, les LT CD8 restent très minoritaires, suggérant que ce mécanisme n'a pas lieu *in vivo*.

L'étude immunohistochimique de la moelle épinière des souris malades a permis de montrer la présence de LT CD8, relativement peu nombreux au regard des LT CD4 qui sont

retrouvés en grande quantité (2 pour 50, respectivement). Au niveau du cervelet, l'infiltration par les LT est moins importante. Les nerfs optiques, classiquement atteints dans le modèle MOG 35-55, sont aussi infiltrés par les LT dans ce modèle LT CD8 dépendant. La forte proportion de LT infiltrés ayant un phénotype activé ne corrèle pas avec le score relativement faible des souris. Nous n'avons pas détecté de cellules régulatrices Tregs FoxP3+ dans ces infiltrats, mais on ne peut exclure la présence d'autres sous-populations de cellules régulatrices. Des plaques de démyélinisation sont clairement visibles chez les souris malades (40 jours après l'immunisation) indiquant qu'il s'agit bien ici d'un modèle d'encéphalomyélite.

En conclusion, nous avons reproduit le modèle de Bettini d'EAE induite par la MOG 37-46 mais avec une incidence nettement plus faible que celle rapportée. L'analyse des lésions de ces souris indique que l'infiltrat y est constitué très majoritairement de LT CD4 par rapport aux LT CD8, les 2 populations ayant un phénotype activé *in vivo*.

B.) Amélioration du modèle MOG 37-46

Dans le but d'augmenter l'incidence du modèle CD8 dépendant et d'inverser le ratio CD4/CD8, un nouveau protocole a été mis en place à partir des animaux n'ayant pas développé la maladie. En parallèle, une nouvelle méthode d'analyse par cytométrie de flux de l'infiltrat cellulaire a été élaborée afin de mieux caractériser le phénotype des cellules infiltrées dans une portion de moelle épinière.

a.) Matériels et méthodes

1.) Augmentation de l'incidence de la maladie

Les souris n'ayant déclaré aucun symptôme de la maladie (faiblesse musculaire, ataxie, fléchissement de la queue ou perte de poids) à 30-40 jours ont une nouvelle fois été réimmunisées par injection sous-cutanée avec 50µl de l'émulsion composée MOG (20µg)/CFA/MT (Figure 16), sous anesthésie légère. En effet, nous avons déjà démontré que même si les souris ne développent pas la maladie, elles possèdent une autoréactivité LT CD8 anti-MOG 37-46 persistante en périphérie. L'intérêt d'utiliser cette dose minimale de peptide (20µg), appelée boost ou rappel, est de réactiver spécifiquement ces LT CD8 mémoires.



Figure 16 : protocole d'immunisation du « boost »

Les souris initialement immunisées avec deux injections de peptide MOG 37-46 (200µg)/CFA/MT n'ayant pas développé la maladie ont été réimmunisées avec 20µg de peptide afin de réactiver les LT CD8 périphériques

Les souris réimmunisées ont reçu également les deux injections de PTX (300ng/souris) à J0 et J2 du boost. Les souris, suivies d'un point de vue clinique et pesées chaque jour, sont ensuite anesthésiées et sacrifiées selon le protocole décrit précédemment. Les organes d'intérêts sont prélevés ; pour la moelle épinière on utilise une technique de flushing permettant de récupérer la moelle épinière via une injection sous pression d'HBSS au niveau du bas de la colonne vertébrale. Les méninges restent ainsi accrochées dans la colonne vertébrale. Les organes sont ensuite congelés et conservés à -80°C.

2.) Développement d'une nouvelle méthode de caractérisation de l'infiltrat cellulaire

Une méthode d'analyse des cellules immunitaires de l'infiltrat du SNC par cytométrie de flux a été mise en place dans le but d'augmenter le nombre de marqueurs analysables (par rapport aux 2 ou 3 marqueurs que l'on peut tester simultanément en immunohistochimie) et de l'appliquer à chaque souris. Cette méthode est basée sur le protocole légèrement modifié de Lipton et al. (Lipton et al., 2005) et permet de s'affranchir de l'élimination de la myéline, une des étapes de procédures classiques d'isolement (Méthode du gradient de Ficoll ou du kit Myelin Removal de Miltenyi) qui engendre une perte très importante de cellules immunitaires, voire même un biais dans la composition des cellules immunitaires récoltées (observation personnelle). Ces protocoles classiques d'isolement nécessitent le regroupement

d'au moins 3-5 moelles épinières pour pouvoir réaliser l'analyse par cytométrie des flux de l'infiltrat. Au contraire, la méthode de Lipton nous a permis d'analyser les cellules immunitaires présentes dans une seule moelle épinière à partir d'une simple dissociation de cellules du SNC. De plus, la technique de flushing évite une contamination par les cellules présentes dans les méninges et permet l'analyse des cellules du parenchyme nerveux et essentiellement, de son infiltrat et des cellules microgliales. Le principe de cette méthode contrairement à une analyse FACS directe classique repose sur la perméabilisation de toutes les cellules et sur le marquage de leur noyau au DAPI afin de pouvoir sélectionner les cellules nucléées lors de l'analyse cytométrique en excluant ainsi les débris cellulaires nombreux et la myéline de la suspension cellulaire.

Méthode : La moelle épinière est incubée dans un bain de HBSS/MgCl₂ (1mM), collagénase D (1mg/ml) et DNase I (1mg/ml) durant 20 minutes à 37°C. Les cellules sont dissociées en les tamisant sur un filtre de 100 µm, lavées au HBSS, puis retamisées sur un filtre de 70 µm, avant d'être une nouvelle fois lavées et reprises dans du milieu HBSS à 4°C. Les cellules sont ensuite marquées extracellulairement avec les anticorps d'intérêts couplés à des fluorochromes pendant 15 minutes à 4°C. Après deux lavages successifs, la suspension cellulaire est incubée pendant 20 minutes dans une solution perméabilisante (BD CytoFix/CytoPerm BD554714, Biosciences). Les cellules sont lavées deux fois dans une solution de lavage post-perméabilisation (BD PermWash BD554723) et reprises dans une solution de PBS contenant du DAPI (1 µg/ml) qui marque spécifiquement le noyau des cellules d'intérêts (cellules immunitaires et microglie). La plupart des autres cellules du parenchyme nerveux, de part leurs propriétés très fragiles, sont détruites durant la période de digestion et de dissociation. Lors de la lecture au cytomètre, il suffit de cibler l'analyse à partir des cellules nucléées DAPI+.

Toutes les cellules ont été marquées avec le même cocktail d'anticorps afin de sélectionner les cellules immunitaires (Tableau C). Cette base, composée des anticorps CD11b et CD45, va permettre de différencier les lymphocytes des cellules microgliales et des macrophages/neutrophiles grâce à la méthode d'identification suivante (Figure 17).

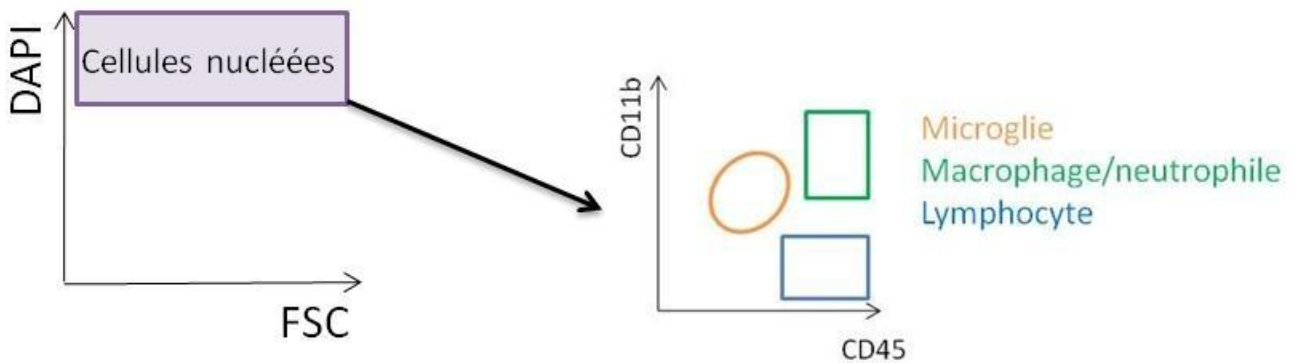


Figure 17 : Exemple de sélection des populations d'intérêt lors de l'analyse cytométrique

La méthode de marquage au DAPI des cellules perméabilisées permet de visualiser les cellules nucléées par cytométrie de flux. Grâce à cette propriété, les cellules nucléées vont pouvoir être directement sélectionnées en fonction de leur fort marquage DAPI et de leur taille relative (FSC : Forward scatter). Au sein de cette population, les marquages CD45 et CD11b vont être regardés afin de déterminer différentes sous-populations : les lymphocytes (CD45+CD11b-), les cellules microgliales (CD45^{faible}CD11b+) et les macrophages/neutrophiles (CD45+CD11b+).

Ensuite, d'autres anticorps ont été rajoutés au cocktail de base en fonction des études réalisées. En effet, les différentes analyses effectuées à partir de ce marquage de base ont permis de regarder la proportion lymphocytaire au sein du SNC (LT CD8 : anti-CD3 et 8, LT CD4 : anti CD3 et CD4), le phénotype mémoire des cellules (anti-CD44 et CD62L), le profil régulateur (anti-FoxP3, CD122 et PD-1) ou d'activation (anti CD44, CD69).

Anticorps	Fluorochrome	Référence	Fournisseur	Concentration
CD11b	APC	553312	Biosciences	1/400
CD11b	APC-Cy7	557657	Biosciences	1/500
CD45.2	APC-Cy7	560694	Biosciences	1/400
CD45.2	FITC	553772	Biosciences	1/200
CD3	FITC	553062	Biosciences	1/200
CD3	PerCPCy5.5	551163	Biosciences	1/400
CD4	A700	557956	Biosciences	1/200
CD8	PeCy7	552877	Biosciences	1/500
CD8	PE	553033	Biosciences	1/400
CD62L	PerCPCy5.5	560513	Biosciences	1/200
CD44	A700	560567	Biosciences	1/200
CD44	APC	559250	Biosciences	1/200
CD122	FITC	554452	Biosciences	1/200
PD1	PE	551892	Biosciences	1/400
Foxp3	PE	12-5773-80	ebiosciences	1/200
CD69	FITC	561629	Biosciences	1/200

Tableau C : Anticorps utilisés en cytométrie de flux

b.) Résultats1.) Incidence

Un boost par le peptide MOG au 40^e jour permet d'augmenter l'incidence de la maladie à 80%, avec un développement à partir d'une dizaine de jours après ce rappel. Des contrôles ont été réalisés afin de valider que le développement de la maladie est dû au boost et non à la réimmunisation avec de l'adjuvant ou à l'injection de PTX ou à une réimmunisation avec une forte quantité de peptide. Trois souris contrôles n'ayant reçu que le CFA/PBS + PTX ou que la PTX n'ont pas développé de maladie. Il en est de même pour des souris contrôles immunisées avec la 20 µg de peptide de la MOG.

2.) Validation de la méthode modifiée d'après Lipton (Lipton et al., 2005)

Afin de vérifier que cette méthode marque correctement les cellules nucléées, nous avons réalisé ce protocole à partir de cellules issues de SNC de souris naïves. Les souris naïves ne présentant pas d'infiltrat cellulaire au sein de leur SNC, nous n'attendons pas de marquage hormis des cellules microgliales (Figure 18).

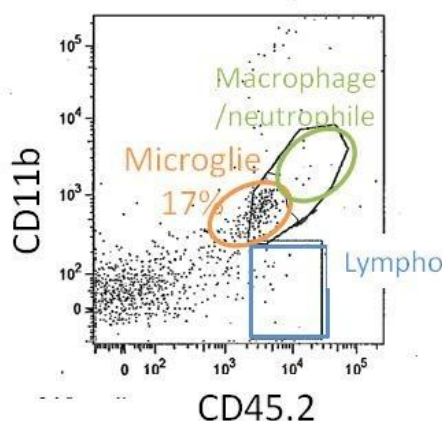


Figure 18 : Sélection des populations cellulaires CD45⁺/int CD11b⁺/ - à partir d'un extrait de moelle épinière de souris naïve

L'analyse cytométrique des cellules issues du SNC d'une souris naïve après sélection positive au DAPI et marquage CD11b et CD45.2 permet de détecter essentiellement les cellules microgliales du SNC de souris naïve.

Les résultats attendus coïncident avec ce qui est attendu chez une souris naïve, c'est à dire une quasi-absence de cellules immunitaires et pour cette souris 17% de cellules microgliales (Cd45int CD11b+).

3.) Caractérisation des infiltrats des souris MOG 37-46 boostées

L'analyse en cytométrie de flux permet de déterminer avec précision la proportion de chaque type cellulaire immunitaire dans la moelle épinière. Ainsi pour une souris de score 3 (6 jours de maladie), on détecte 10% de lymphocytes et 47% de cellules immunitaires non-lymphocytaires (CD11b-) dans l'infiltrat CD45.2+. De plus, il y a une forte proportion de LT CD8 (57,2% contre 17,8% de LT CD4, Figure 19).

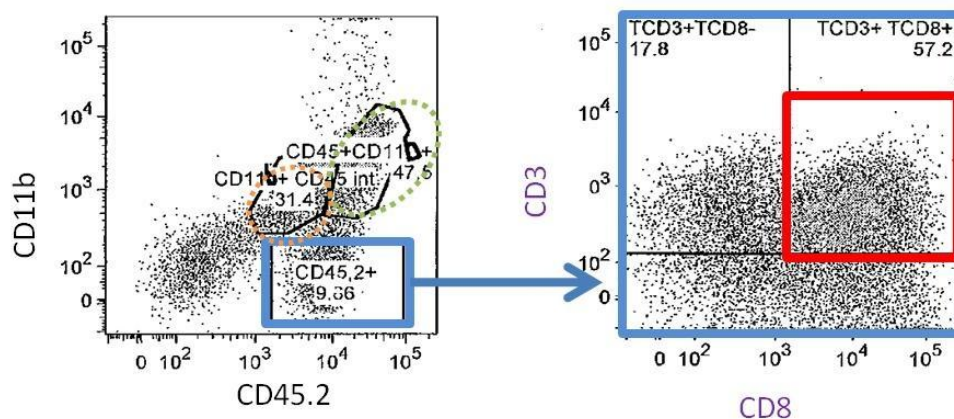


Figure 19 : Le boost entraîne la réactivation et l'infiltration dans le SNC des LT CD8 autoréactifs

L'analyse des cellules issues du SNC d'une souris boostée par le peptide MOG et ayant déclaré une EAE de score 3 montre une forte infiltration de macrophages/neutrophiles (CD45+CD11b+ 47,6%) et de lymphocytes (CD45+CD11b- 9,9%). La composition de la population lymphocytaire est déterminée grâce aux anticorps anti CD3 et CD8. Le boost provoque une forte augmentation de la proportion de LT CD3+CD8+ (57,2%) par rapport aux LT CD3+ CD8- (majoritairement les LT CD4 17,8%).

Le boost a ainsi provoqué une réactivation et une infiltration des LT CD8 autoréactifs présents chez les souris n'ayant pas développé la maladie initialement, après l'immunisation classique avec le peptide MOG 37-46. L'analyse phénotype de cette souris a été complétée par la recherche de LT régulateurs, grâce aux marqueurs FoxP3, CD122 et PD-1 pour s'assurer que les LT CD8 infiltrants ne présentent pas un phénotype régulateur (Figure 20).

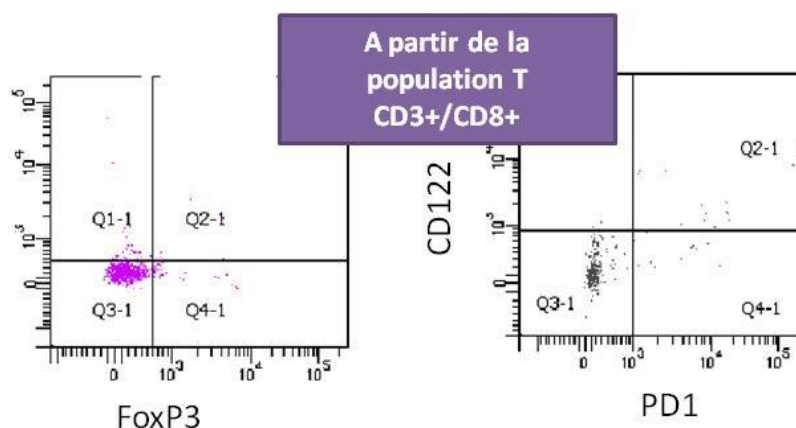


Figure 20 : Les LT CD8 infiltrants n'ont pas le profil régulateur

L'analyse de la population T CD3+/CD8+ issue des cellules du SNC d'une souris boostée ayant déclaré une EAE de score 3 montre que le profil des lymphocytes autoréactifs infiltrants n'est pas régulateur. En effet, ils n'expriment pas le marqueur conventionnel des LT régulateurs naturels FoxP3 ou les marqueurs CD122 avec PD1 caractéristiques d'une autre sous-population de LT CD8 régulateurs chez la souris.

Les résultats montrent que les LT CD8 infiltrants ne sont ni FoxP3+ ni CD122/PD-1+ attestant qu'ils ne possèdent pas un profil régulateur. Enfin, le phénotype mémoire de ces lymphocytes a été déterminé à J2 et à J6 de la maladie afin d'observer si ce phénotype varie en fonction de la durée de la maladie et du score (Figure 21). A J2 de la maladie où le score est de 1, le phénotype des LT est hétérogène comprenant des LT naïfs (CD62L+CD44-, 18,8%) et des LT activés (CD44+CD62L+/-, 33,5%). A J6 de la maladie, la majeure partie des cellules T CD8 sont maintenant des LT CD8 effecteurs/mémoires (CD44+/CD62L-, 87,4%).

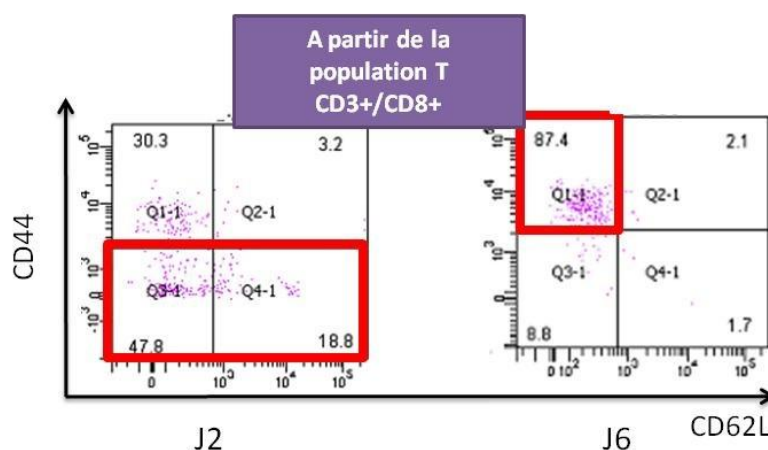


Figure 21 : Différenciation des LT CD8 naïfs en LT CD8 effecteurs mémoires lors du développement de la maladie

L'analyse des LT CD3+ CD8+ issus de SNC de souris boostées à différents stades de la maladie (J2 score 1 et J6 score 3) permet de visualiser une modification du phénotype des LT CD8 grâce aux marqueurs CD62L et CD44. A J2, seulement 30% des LT CD8 présentent le phénotype effecteur mémoire (CD44+CD62L-) alors qu'à J6 87,4% des LT CD8 n'expriment plus le marqueur CD62L et présentent le profil effecteur

Afin de compléter et de valider les premiers résultats obtenus, d'autres SNC de souris « boostées » ont été analysés à 2 jours d'EAE (day post injection (dpe) ou nombre de jour après l'injection : 2, score 1) et 6 jours d'EAE (dpe 6, score 3). Au cours de la maladie, il y a une augmentation de l'infiltration des LT CD4 et CD8 corrélant avec l'aggravation des symptômes cliniques (Figure 22). Cependant, les LT CD8 ne sont pas plus abondants que les LT CD4 comme l'avaient indiqué les premiers résultats. Malgré cela, il est clair que le boost augmente quantitativement le nombre de LT CD8 dans les lésions et ce, proportionnellement au score obtenu chez la souris. La réactivation des LT CD8 par une dose minimale de peptide permet d'obtenir une lésion qui, en ce qui concerne les infiltrats T, se rapproche des lésions des patients atteints de la SEP dans lesquelles on retrouve 1/3 de LT CD4 pour 2/3 de LT CD8.

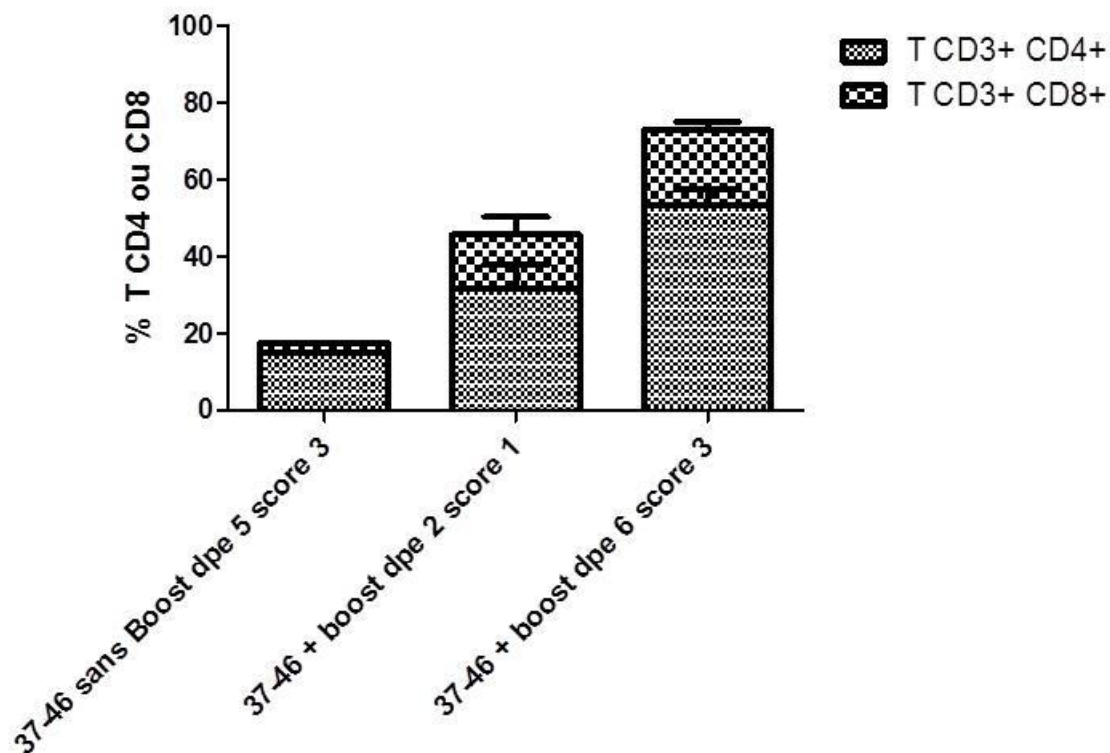


Figure 22 : Le boost permet une augmentation progressive du nombre de LT CD8 lors du développement de la maladie

L'analyse cytométrique de l'infiltrat cellulaire issu de SNC de souris boostées permet d'observer une augmentation progressive du nombre de LT CD8 (anti-CD3 et CD8) en comparaison avec le modèle d'EAE MOG 37-46 non boosté. L'infiltrat lymphocytaire augmente en fonction de la durée de la maladie et du score, avec une augmentation proportionnelle du nombre de TCD4+ et de LT CD8. Lorsque le score 3 est atteint, le nombre de lymphocytes infiltrants est beaucoup plus important chez les souris boostées que chez la souris immunisée classiquement avec le peptide MOG 37-46. De plus, le nombre de LT CD8 est multiplié par 10.

En plus d'augmenter le nombre de LT CD8, le boost permet d'augmenter la proportion des LT CD8 effecteur/ mémoires réactivés, ceux-ci peuvent sécréter de l'IFN γ et amplifier le processus inflammatoire (Figure 23). Cette augmentation de proportion peut être due à la différenciation *in situ* des LT CD8 naïfs ou à la rétention préférentielle des T effecteurs ou effecteurs/mémoires dans le SNC.

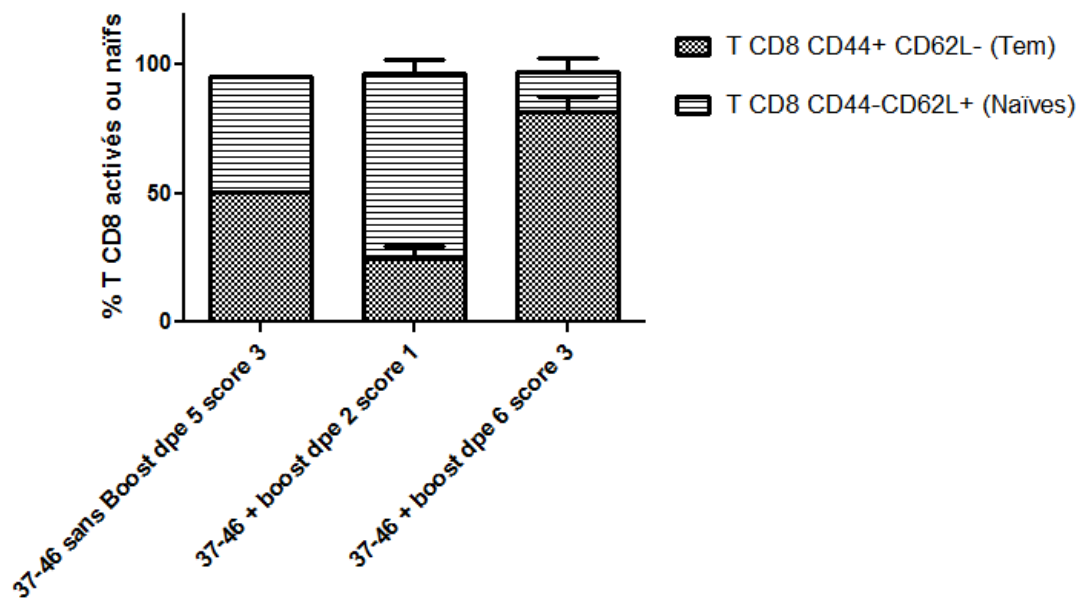


Figure 23 : Enrichissement de l'infiltrat en LT CD8 effecteurs mémoires aux dépens des LT CD8 naïfs

L'analyse cytométrique de la population LT CD8 issue du SNC de souris immunisées classiquement avec le peptide MOG 37-46 ou boostées a permis de révéler qu'il y avait une augmentation des LT CD8 effecteurs ou effecteurs mémoires (CD44+CD62L-) chez les souris boostées à J6 par rapport à J2 et au modèle classique.

L'analyse de la sous-population de LT CD8 effecteurs (CD44+) des souris boostées montre que l'aggravation de la maladie est liée à une augmentation de lymphocytes nouvellement activés (Figure 24). En effet, à J6 la proportion de LT CD8CD44+ présentant le marqueur d'activation précoce CD69 augmente, suggérant une réactivation *in situ* par la MOG.

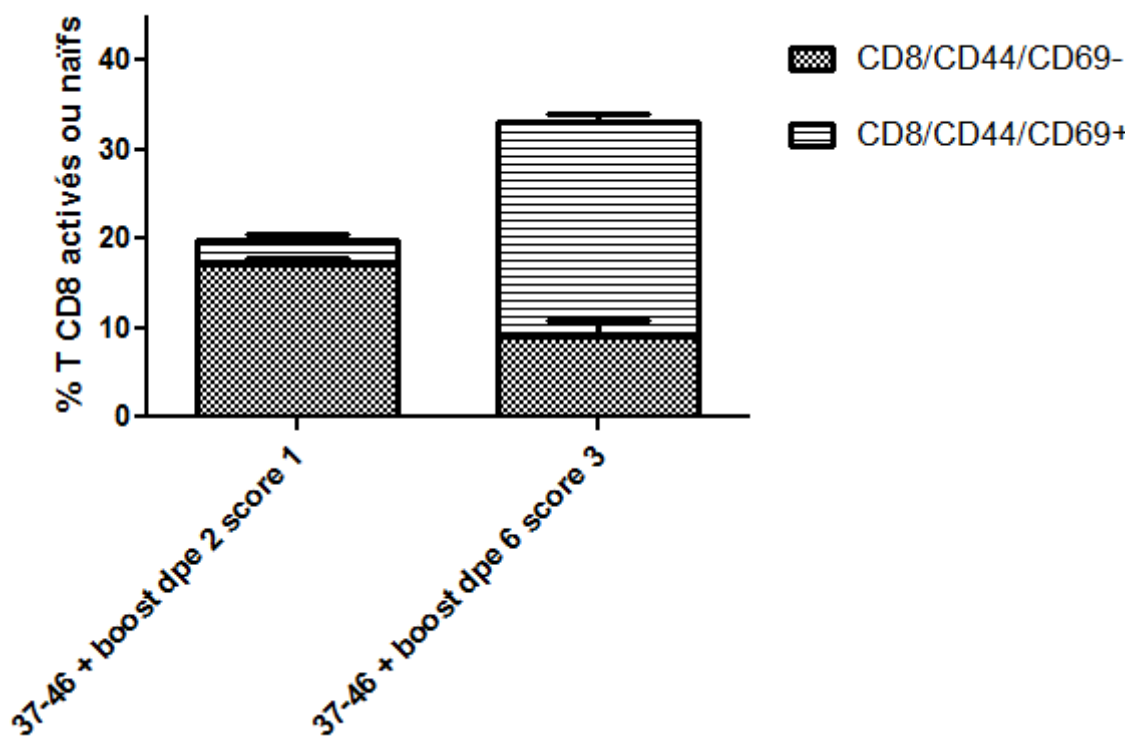


Figure 24 : La présence du marqueur CD69 à la surface des LT CD8 indique que les LT viennent de s'activer

L'analyse cytométrique des LT CD8 effecteurs (CD44+) issus du SNC de souris boostées montre une augmentation de présence du marqueur d'activation précoce CD69 à leur surface à J6. L'augmentation de la proportion des LT CD8 récemment activés à quelques jours d'EAE corrèle avec le score clinique plus élevé.

c.) Discussion

A l'heure actuelle, il n'y a pas de modèle murin EAE (sans infection virale) qui permettrait de reproduire de façon stable des lésions du SNC dans lesquelles on retrouverait une prépondérance (60-70 %) de LT CD8 par rapport aux LT CD4, comme dans la majeure partie des lésions SEP (Salou et al., 2013). C'est pourquoi nous nous sommes intéressés à des modèles dont la maladie est clairement initiée par des LT CD8, au contraire des autres modèles classiques EAE. Nous avons évalué le modèle d'EAE active induite par l'épitope CD8 du peptide tronqué de la MOG 35-55 décrit par le groupe de Bettini en 2009 et rapporté par ce seul groupe (Bettini et al., 2009a). Nous n'avons pas obtenu d'incidence de développement de la maladie de 100% mais seulement de 30%, malgré deux immunisations successives espacées d'une semaine. Les différences de conditions sanitaires de nos animaleries pourraient être incriminées. De nombreuses données de la littérature ont en effet

montré l'importance de l'environnement et du microbiote des individus dans la modulation de l'induction de l'EAE (Berer et al., 2011).

La caractérisation neuroanatomopathologique montre chez les souris malades (présentant une perte de la tonicité de la queue, ou éventuellement une parésie des membres inférieurs), un infiltrat T dans la moelle épinière majoritairement constitué de LT CD4. Ces lymphocytes ont un phénotype activé (OX40+) non régulateur (Foxp3-), suggérant une autoréactivité LT CD4 contre la myéline. En effet, les lymphocytes sont majoritairement retrouvés dans les zones de substance blanche qui est plus riche en myéline que la substance grise. Comme rapporté dans la publication de Bettini, une autoréactivité LT CD8 se développe clairement contre le peptide MOG 37-46 suite à l'immunisation. Cette autoréactivité a été mise en évidence dans la rate des souris immunisées, même 30-40 jours après l'immunisation. C'est pourquoi nous avons testé une immunisation supplémentaire chez les souris n'ayant développé aucun signe neurologique avec une quantité de peptide (20 µg) qui n'induit pas de maladie chez des animaux témoins. Cette réactivation périphérique des LT CD8 engendre alors une EAE rapide avec une sévérité qui atteint un score de 3-4.

L'analyse individuelle de la moelle épinière des souris par cytométrie de flux permet de démontrer que la restimulation des lymphocytes en périphérie avec 20 µg de peptide favorise l'infiltration des LT avec un certain enrichissement en LT CD8 par rapport au LT CD4 (variable selon les expériences). De plus, nos données indiquent que les LT CD8 retrouvés dans la moelle épinière au pic de la maladie, sont récemment activés supposant une activation locale. Ces données suggèrent que la réactivation de LT CD8 mémoires périphériques peut plus facilement induire une EAE que des LT CD8 naifs récemment activés par la MOG (dans le cas d'une immunisation classique).

Cependant, la proportion de LT CD4 infiltrants, dans le SNC de ces souris, n'est pas négligeable. Le rôle des LT CD4 dans le développement de la maladie ne peut donc être exclu. Ce mécanisme a été démontré à l'aide d'un modèle transgénique de souris humanisées pour le CMH-I avec des LT CD8 anti-MOG avec ou sans LT CD4 anti-MOG. Il est montré que dès le début de la maladie (score 1), les LT CD8 sont les premiers à gagner le parenchyme nerveux mais dès le pic de la maladie, ils sont supplantés par les LT CD4 qui eux seuls permettent le développement de la maladie dans ce modèle (Mars et al., 2007). Une récente étude a également essayé d'approcher cette problématique en immunisant par la MOG 35-55 des souris RAG-/- reconstituées avec des LT CD4 et/ou LT CD8 anti-MOG

(Leuenberger et al., 2013). Dans cette étude, même si les LT CD8 parviennent à infiltrer le SNC, ils n'induisent pas de maladie. Ce n'est que lorsque les LT CD4 sont également présents, notamment des Th17, qu'il y a apparition des symptômes. Les auteurs concluent que les LT CD8 anti-MOG ne représentent qu'un épiphénomène. Néanmoins, il se peut que le fond RAG utilisé et dans lequel les LB sont également absents, apporte un biais, au vu des récentes données démontrant l'importance des LB dans la SEP et l'EAE. Dans notre modèle, afin de savoir si les LT CD8 anti MOG 37-46 mémoires réactivés en périphérie suffisent à induire la maladie, il faudrait réaliser le même protocole d'immunisation chez des souris uniquement dépourvues de LT CD4. Ces différentes données indiquent qu'il existe encore des zones d'ombre quant au pouvoir pathogénique et à la différenciation des LT CD8 anti-myéline chez la souris.

III. Le modèle de souris DKI

En parallèle du modèle d'EAE active avec la MOG 37-46, un nouveau modèle LT CD8 dépendant a été évalué au sein du laboratoire à partir des souris transgéniques produites par Saxena en 2008 (Saxena et al., 2008). Ce modèle de souris transgéniques est basé sur l'expression oligodendrocytaire de l'antigène transgénique hémagglutinine (HA) qui est reconnu par les LT CD8 anti-HA₅₁₂₋₅₂₀ (issus de la souche CL-4)

A.) Description du modèle de Saxena et al

Les oligodendrocytes expriment l'antigène du virus Influenza HA grâce à un double procédé de Knock-In (DKI : Double Knock In). Les souris DKI sont issues du croisement des souris MOGiCre et ROSA26StopHA. Le transgène MOGiCRE contient par insertion délétion, entre les exons 1 et 2 du gène de la protéine MOG, le gène CRE. L'expression de la CRE est donc sous le contrôle d'un promoteur de la MOG, une protéine exclusivement oligodendrocytaire.

Le transgène Rosa26HA contient par insertion le gène codant pour HA, précédé de deux zones loxP (GCATACAT) pouvant être spécifiquement clivées par l'enzyme CRE. Entre ces deux zones loxP se trouve une séquence codant pour un codon stop, empêchant toute expression de HA en l'absence d'action de la CRE (Figure 25).

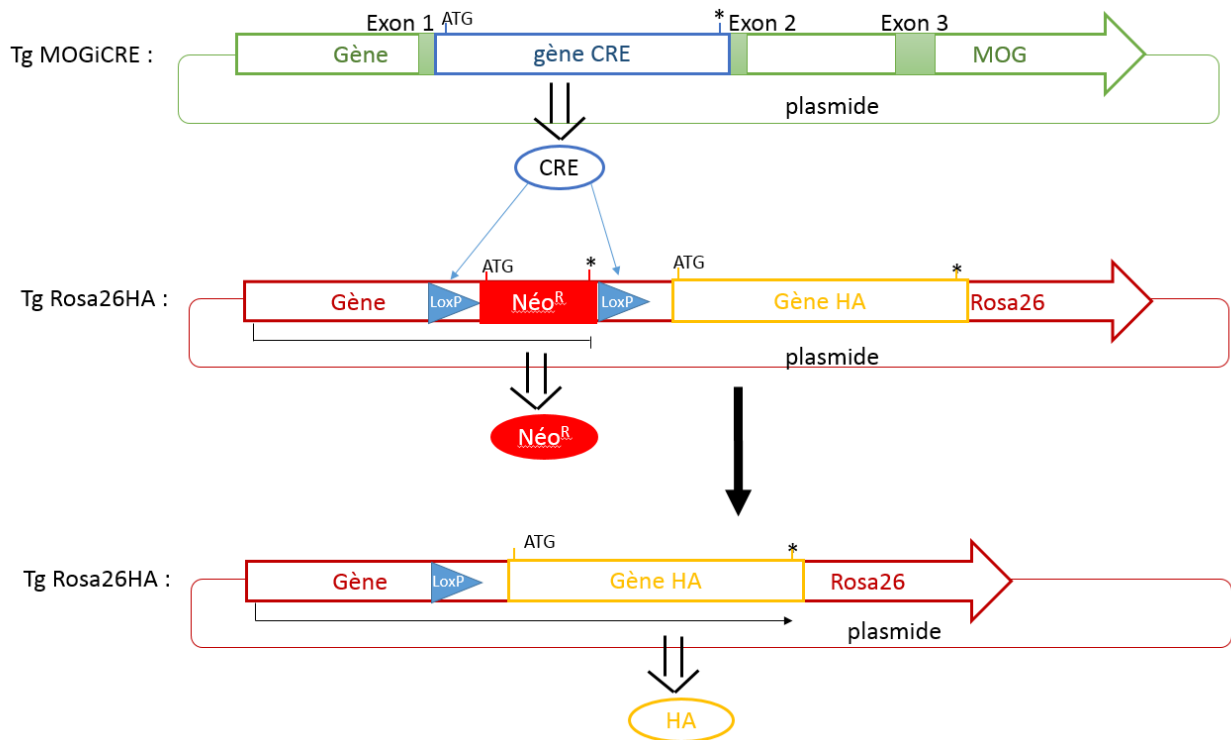


Figure 25 : fabrication des transgènes DKI (d'après la thèse d'Emilie Bergereau 2009)

La modification génétique des souris de la souche balb/c via deux Knock-in va permettre l'obtention d'une souris qui va présenter l'antigène HA sur les oligodendrocytes uniquement. Ce modèle a été décrit précédemment par Saxena (Saxena et al., 2008)

Afin d'obtenir une EAE CD8 dépendante, Saxena et al. ont croisé les souris DKI exprimant HA sur les oligodendrocytes avec des souris CL4 transgéniques pour le clone lymphocytaire LT CD8 anti-HA512-520. Les souris issues de ce croisement n'ont développé aucun signe d'encéphalomyélite. Après avoir vérifié, *in vitro*, via un pentamère HA, qu'il n'existait pas une délétion ou une déplétion des clones LT CD8 anti-HA, l'équipe a suggéré qu'une cross-présentation de l'antigène HA dans les organes lymphoïdes rendrait les CL4 anergiques. Mais, l'expression de HA en dehors du SNC n'a pas encore été démontrée.

Seul le transfert passif de LT CD8, issus de souris CL4, activés en présence du peptide, *in vitro*, permet d'obtenir une baisse de poids chez les souris, associée à une rapide infiltration de cellules inflammatoires dans les nerfs optiques et la moelle épinière avec démyélinisation, mais à priori sans symptôme locomoteur.

Le but de notre travail a été d'évaluer ce modèle dans nos conditions d'animalerie, en espérant obtenir une forte infiltration de LT CD8 dans le parenchyme nerveux et éventuellement, des symptômes cliniques. Cela constituerait alors un modèle qui pourrait reproduire la forte présence de LT CD8 observés chez les patients atteints de la SEP et nous permettrait d'étudier l'influence de cet infiltrat T sur la réactivité astrocytaire. L'avantage théorique de ce modèle repose sur le fait que les LT CL4 ont une forte affinité pour le peptide HA donc, ils sont moins dépendants du "CD4 help" que les lymphocytes ayant un TCR de faible affinité (Bos et al., 2012), comme les LT CD8 anti-MOG 37-46.

B.) Amélioration du modèle DKI-CL4 : Augmentation de la perméabilité de la BHE

Une des hypothèses qui expliquerait le faible taux de LT CD8 dans le parenchyme nerveux est la présence de la BHE. Afin de faciliter l'infiltration des LT CD8 injectés, une injection de PTX (Su et al., 2001) ou une irradiation légère des souris DKI receveuses 24 heures avant le transfert passif de clone CD8 anti-HA, a été réalisée. Une faible irradiation (<4 Gy) des souris favorise effectivement l'induction de l'EAE dans la souche Balb/c qui est relativement résistante à l'induction de la maladie (Erälinna et al., 1994). De plus, l'irradiation augmente la survie des LT injectés sans affecter drastiquement le système immunitaire de la souris (Stromnes and Goverman, 2006).

a.) Matériels et méthodes

1.) Amplification de LT CD8 autoréactifs envers le peptide HA à partir de LT CD8 de souris CL4

Les LT CD8 sont obtenus à partir de splénocytes de souris transgéniques TCR-CL4 à partir d'un tri magnétique positif des LT CD8 (CD8a Microbeads, Mouse 130-049-401, Miltenyi). En parallèle, des splénocytes totaux issus de souris Balb/c naïves sont isolés après dissociation de la rate. Le peptide est chargé à la surface des splénocytes après incubation de

30 minutes avec 5 μ M du peptide HA (Proimmune 512-520 LYSTVASSL) à 37°C. Après trois lavages successifs, les splénocytes chargés, sont ensuite irradiés, à une dose de 35 Greys.

Après dénombrement des LT CD8, ces derniers sont mis en culture avec les splénocytes totaux irradiés de Balb/c naïves dans des plaques 24 puits dans un volume final de milieu DMEM complet (DMEM, Gibco ; SVF 10% ; Sodium pyruvate 1mM ; Acides aminés non essentiels 1% ; Tampon Hepes 5mM ; Pénicilline 100U/ml ; streptomycine 0,1mg/ml ; L-glutamine : 2mM ; B-mercaptoéthanol $5 \cdot 10^{-5}$ M) en respectant le ratio 1/5 (soit $1 \cdot 10^6$ LT CD8 pour $5 \cdot 10^6$ splénocytes dans 2ml). La co-culture est incubée pendant 3 jours à 37°C 5% CO₂ en présence de 5U/ml d'IL2 (Roche Diagnostic, 11 147 528 001) et 20ng/ml d'IL-12 (R&D Systems 419-ML). Après cette première phase d'activation des lymphocytes, ces derniers sont poolés et dénombrés. Deux volumes de milieu complet DMEM avec uniquement 5U/ml d'IL2 sont ajoutés à la suspension de LT CD8, avant d'être réensemencés à raison de 1,5ml/puits dans une plaque 24 puits et incubés à 37°C. Après 2 jours d'amplification, les lymphocytes sont lavés deux fois et dénombrés. L'amplification attendue avec ce protocole est de x 15, au vue des précédents tests réalisés. Un marquage extracellulaire avec les anticorps anti-CD3, CD8, CD44, CD62L est réalisé pendant 15 minutes afin de confirmer le profil de type Tc1 des LT CD8 par cytométrie de flux .

2.) Préparation des souris DKI

Les souris DKI (obtenues à partir de croisements de souris issues de la lignée Rosa26tm(HA) 1Libl et MogiCre dans le fonds Balb/c obtenues par le Dr R. Liblau) sont hébergées dans des cages dans une pièce où la température, l'humidité et la lumière sont contrôlées. Les animaux ont libre accès à l'eau et à la nourriture (alimentation standard, Special Diet Services, Witham, Essex, United Kingdom).

Afin de favoriser le passage des LT CD8 Tc1 dans le SNC, deux techniques ont été testées 24 heures avant le transfert. La première étant une légère irradiation (2Gy) des souris receveuses, la seconde étant une injection i.p de 300 ng de PTX.

3.) Transfert des LT CD8 anti-HA

Quatre groupes de souris DKI ont été étudiés: un groupe contrôle avec des souris DKI naïves (n=4), un groupe avec des souris DKI irradiées (n=5) et enfin un groupe de souris ayant reçu une injection de PTX (n=4) et un groupe « contrôle irradiation » a été réalisé afin de vérifier que l'irradiation n'entraîne pas de troubles neurologiques et de perte de poids (n=5). Aux trois premiers groupes, 1.10^7 de LT CD8, issus de l'amplification préalablement décrite, sont transférés, en i.p, aux souris. Un groupe « contrôle irradiation » a été réalisé afin de vérifier que l'irradiation n'entraîne pas de troubles neurologiques et de perte de poids (n=5). Le suivi pondéral et clinique a été réalisé à partir du 6ème jour post-transfert et ce jusqu'au 18^{ème} jour. A J18, toutes les souris ont été anesthésiées et sacrifiées par transfusion de PBS intra-cardiaque comme décrit précédemment. Le cerveau, la moelle épinière ainsi que les nerfs optiques ont été immédiatement récupérés afin d'être congelés à -80°C.

4.) Marquages immunohistochimiques

Des coupes de 12 µm de SNC ont été réalisées à l'aide d'un cryostat. Les marquages ont été effectués dans des conditions classiques d'immunohistochimie décrites précédemment. Différents anticorps ont été utilisés afin de mieux caractériser les potentielles zones de lésions : un anti-NogoA pour identifier les oligodendrocytes et des anti-CD3 et anti-CD8 pour observer une infiltration de LT CD3+CD8+ (Tableau B). Les coupes ont enfin été incubées avec une solution de DAPI pendant 5 minutes afin de marquer les noyaux des cellules.

b.) Résultats1.) Activation des LT CD8 anti-HA

Dans un premier temps, le phénotype des LT CD8 issus de l'amplification in vitro est contrôlé afin de vérifier que les cellules amplifiées sont des LT CD3+CD8+ activés. La figure 26 représente un exemple de résultats obtenus après analyse cytométrique du produit de l'amplification composée majoritairement de LT CD3+CD8+ exprimant le marqueur d'activation CD44 mais n'exprimant plus le marqueur CD62L. Après activation, les LT CD3+CD8+ amplifiés possèdent donc un profil effecteur.

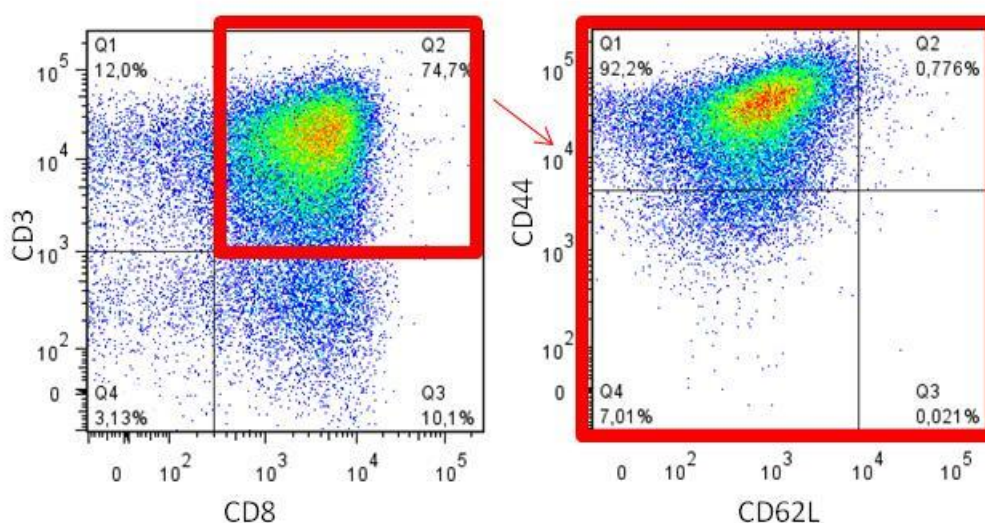


Figure 26 : Les LT CD3+CD8+ amplifiés acquièrent le phénotype T effecteurs CD44+/CD62L-

L'analyse des LT CD8 cultivés durant 5 jours avec le peptide HA512-520 montre une amplification de la sous-population CD3+CD8+ ayant un profil CD44+CD62L-.

2.) Suivi pondéral et score clinique des souris transférées

Les souris ayant reçu une dose d'irradiation sans transfert de cellules ont supporté l'irradiation au traitement. Elles n'ont présenté aucun signe neurologique différent des autres groupes. Durant les 18 jours, le suivi pondéral des 4 groupes de souris n'a montré aucune perte de poids significative (>2g, Figure 27). De plus, aucun trouble n'a été décelé : pas de perte de tonus de la queue, de trouble moteur (tremblements, parésie, locomotion anormale) et pas de faiblesse musculaire.

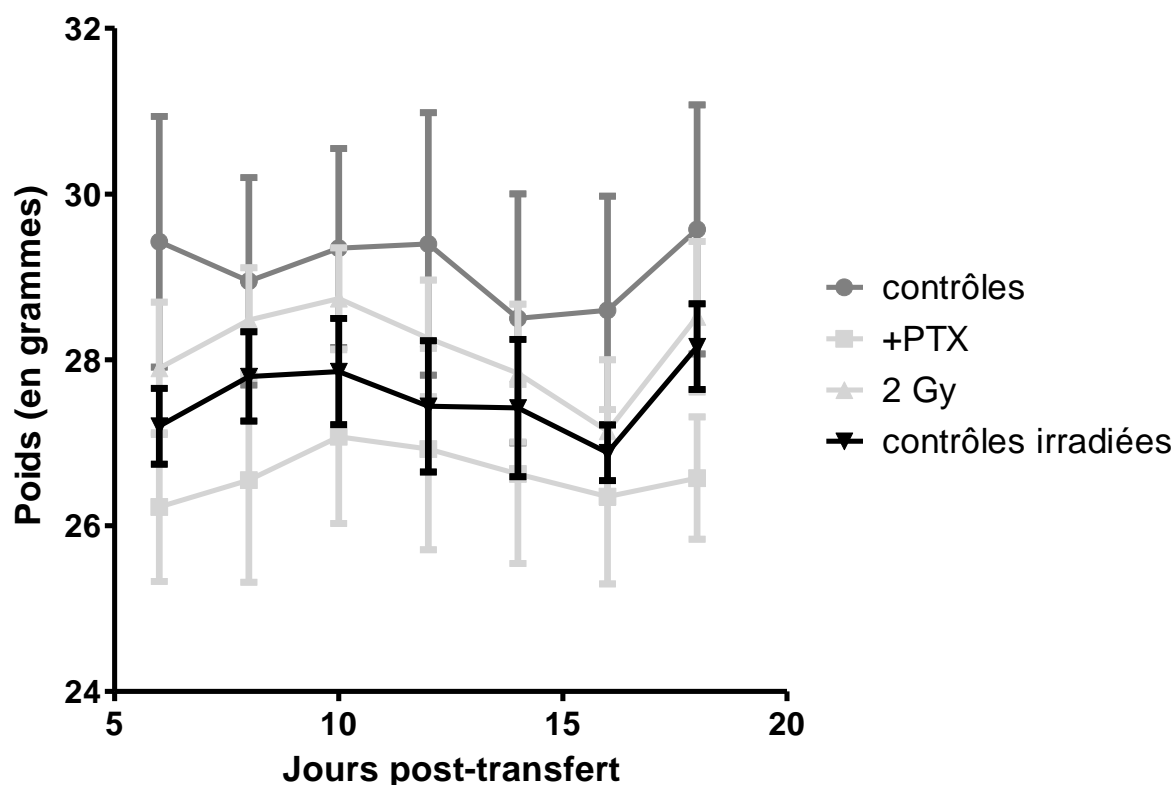


Figure 27: Le transfert passif de lymphocytes autoréactifs anti-HA n'entraîne pas de perte de poids chez les souris DKI naïves

Les LT CD8 anti-HA issus de souris CL4 ont été réactivés *in vitro*, durant 5 jours, en présence du peptide HA, d'IL-2 et d'IL-12. A la fin de l'amplification, 1.10^7 LT CD8 autoréactifs ont été injectés dans des souris DKI ayant été traitées (ou non pour les contrôles) par une injection de PTX ou par une faible dose d'irradiation. Le suivi pondéral des souris ne montre pas de modification dans les différents groupes. Un groupe de souris irradiées non transféré a été suivi en parallèle pour contrôler les effets de l'irradiation.

3.) Marquage IHC des oligodendrocytes et LT

Chez les souris du groupe contrôle, des oligodendrocytes sont visibles grâce au marquage de la protéine membranaire NogoA au sein de la substance blanche (et de la substance grise). Sur la figure 28, ils sont représentés par les flèches indiquant des oligodendrocytes. Aucun LT n'est retrouvé dans le parenchyme nerveux de ces souris contrôles.

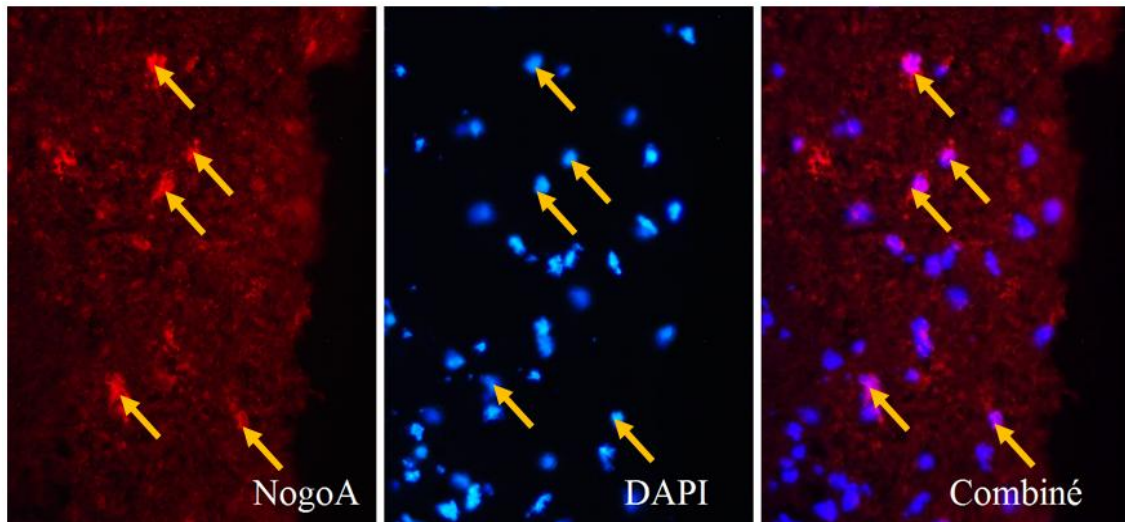


Figure 28 : Marquage des oligodendrocytes par NogoA

Microscopie à fluorescence réalisée sur des coupes de 12 μm d'une moelle épinière de souris DKI naïves (objectif X 40). Les oligodendrocytes sont marqués spécifiquement par l'anticorps NogoA (en rouge) et leur noyau par le DAPI (bleu). Les flèches pointent les oligodendrocytes présents dans le parenchyme nerveux. (Objectif X20)

De plus, l'irradiation seule, des souris contrôles, n'induit pas une infiltration non-spécifique des LT dans le parenchyme nerveux car aucun marquage CD3 n'a pu être détecté dans le groupe "contrôle irradiation". Le marquage DAPI permet de montrer qu'il n'y a pas d'infiltration massive et dense de cellules non-résidentes au SNC.

Les souris ayant reçu une injection de PTX présentent le même profil que les souris du groupe « contrôle », c'est-à-dire une absence d'infiltrat cellulaire dans le SNC. L'injection de PTX 24 heures avant l'injection des lymphocytes autoréactifs n'est pas suffisante pour induire l'entrée des LT dans la moelle épinière ou que les lymphocytes requièrent des facteurs supplémentaires pour être retenus dans le parenchyme nerveux.

Par contre, une infiltration de LT majoritairement de type CD8 de la moelle épinière est observée dans les 5 souris irradiées transférées avec des LT CD8 activés (Figure 29). Par conséquent, l'irradiation a favorisé l'entrée et/ou la rétention des LT CD8 autoréactifs dans le parenchyme nerveux.

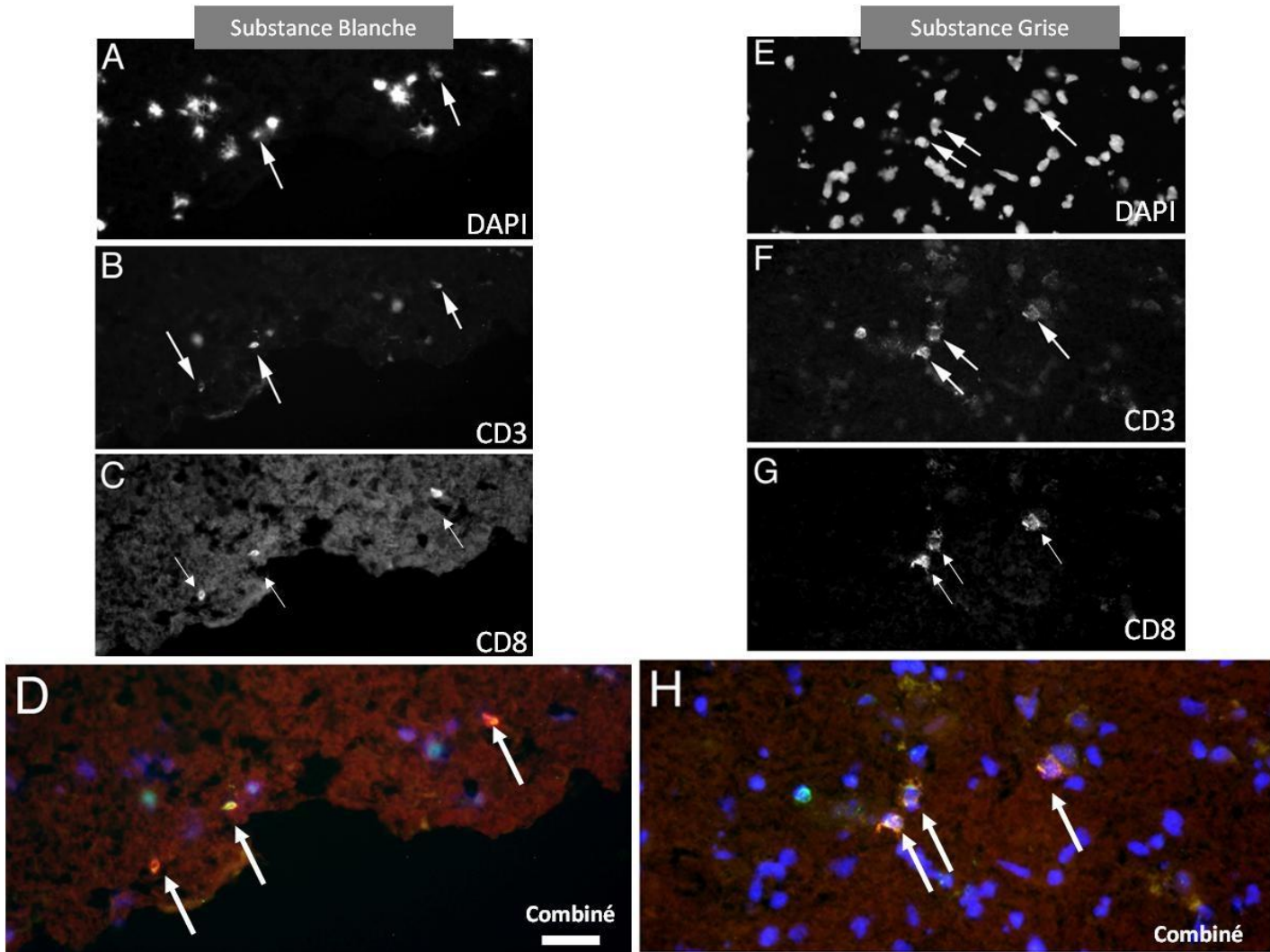


Figure 29 : L'irradiation (2Gy) des souris DKI receveuses avant le transfert adoptif des CL-4 TC1, permet l'infiltration de LT CD8 dans le parenchyme nerveux

Microscopie à fluorescence à partir de coupe de moelle épinière de souris DKI irradiées (2Gy) ayant été reçues par transfert adoptif 1.10^7 LT CD8 autoréactifs stimulés au préalable 5 jours *in vitro* avec le peptide HA, de l'IL-2 et de l'IL-12. Les marquages anti-CD3 (B et F), anti-CD8 (C et G) et DAPI (A et E) permettent d'observer une infiltration de LT CD3+CD8+ dans le parenchyme nerveux des souris irradiées indiquée par une flèche (marquage combiné D et H). Il existe une infiltration dans la substance blanche (A, B, C, D) et dans la substance grise (E, F, G, H). Echelle : 100 μ m (objectif X20)

Cependant, il existe de nombreux LT majoritairement CD8- (donc indirectement en majorité CD4+) dans les méninges (Figure 30). Cette méningite doit être confirmée. Elle

pourrait probablement être importante car elle a été associée à une perte axonale tout au moins dans le cortex comme l'a démontré récemment Androdias dans une étude post-mortem effectuée sur le SNC de patients atteints de la SEP progressive (Androdias et al., 2010).

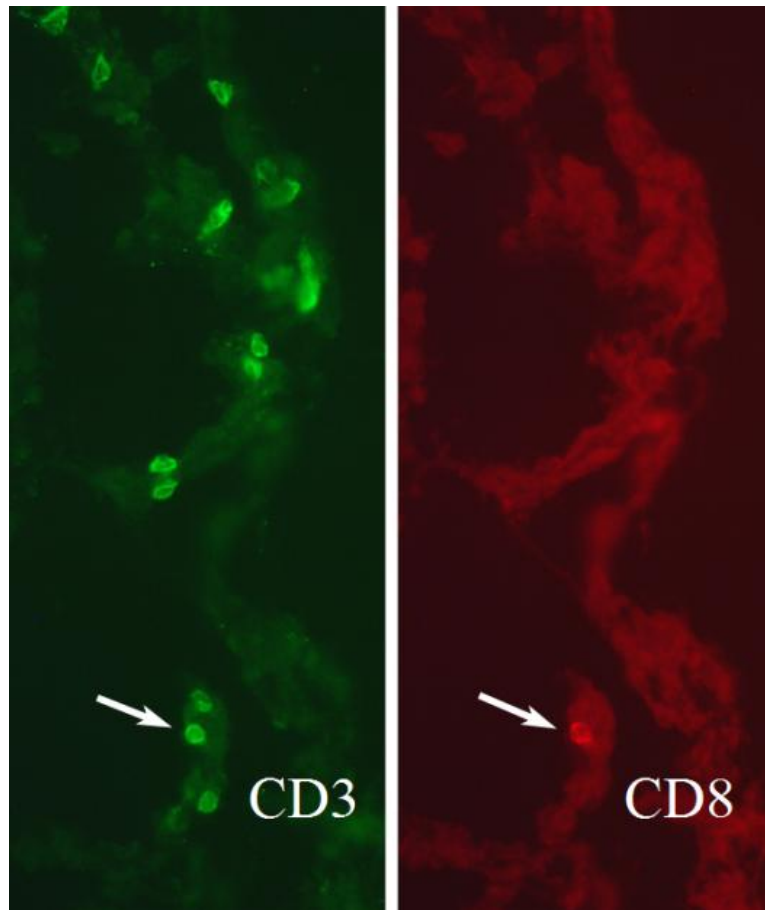


Figure 30 : Détection de LT majoritairement T CD3+CD8- dans les méninges

L'analyse en microscopie à fluorescence sur des coupes de méninges de souris DKI irradiée et transférée par les CL4 Tc1 indique que les méninges contiennent de nombreux LT (marquage anti-CD3 en vert) dont la majeure partie des LT CD3+ ne co-expriment pas le CD8 (anti-CD8 en rouge) et sont donc considérés comme des LT CD4. (objectif X40)

Enfin, un co-marquage oligodendrocytes/LT montre que dans les souris où il existe un infiltrat lymphocytaire dans le SNC, certains LT se retrouvent effectivement apposés à des oligodendrocytes indiquant la reconnaissance de leur cible antigénique (Figure 31).

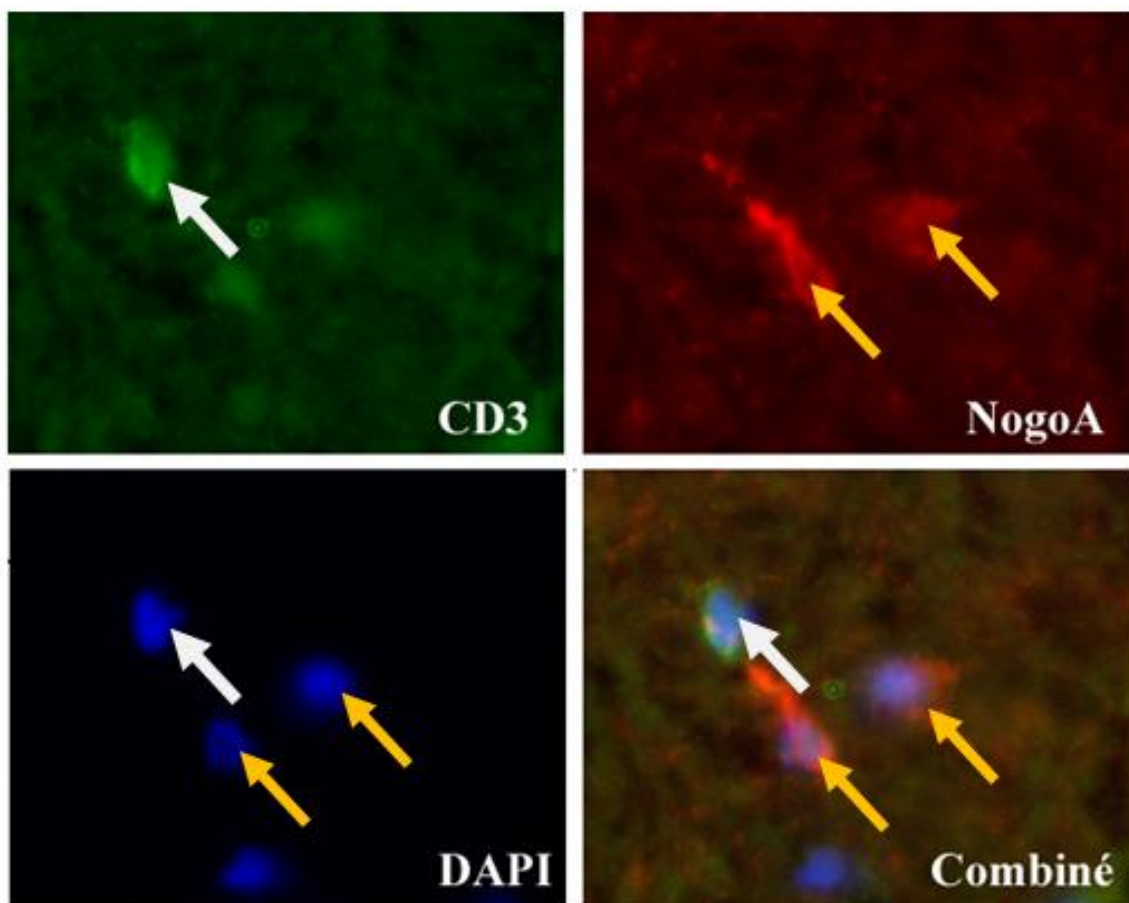


Figure 31 : Visualisation de l'interaction oligodendrocyte-lymphocyte T

L'analyse en microscopie à fluorescence sur des coupes de moelles épinières de souris DKI irradiées à fort grossissement (X62) permet de visualiser l'interaction entre les LT CD3 (anti-CD3 en vert) et les oligodendrocytes (anti-NogoA en rouge indiqué par des flèches jaunes). L'apposition des deux marqueurs est indiquée par une flèche blanche.

c.) Discussion

Nous avons évalué le modèle décrit par l'équipe de Roland Liblau (Saxena et al., 2008). Ce modèle est basé sur l'expression d'une protéine transgénique (HA) sous la dépendance du promoteur MOG. L'utilisation de ce promoteur est judicieuse car l'expression de la MOG est extrêmement spécifique dans les oligodendrocytes, contrairement aux autres protéines de la myéline. De plus, les LT CD8 anti-HA (CL-4) ont l'avantage d'avoir une forte affinité pour leur antigène et donc d'être moins dépendants de l'aide des LT CD4 utiles aux LT CD8 ayant un TCR de plus faible affinité comme pour la MOG 37-46. Nous avons pu reproduire une infiltration majoritairement LT CD8 dans la moelle épinière des souris ayant reçu les anti-HA préactivés *in vitro* durant 5 jours en présence du peptide HA, d'IL-2 et d'IL-12. Cependant, une irradiation légère a été nécessaire pour observer cette infiltration. Les LT CD8 y sont localisés de façon très éparse et il n'y a pas d'infiltration massive d'autres cellules immunitaires. De plus, les souris ne présentent pas de signes cliniques apparents malgré la présence de LT CD8 apposés sur des oligodendrocytes indiquant leur reconnaissance effective. Par conséquent, l'utilisation de ce modèle pour étudier les étapes neuroinflammatoires qui ont lieu après l'infiltration de ces LT pathogéniques se révèle peu avantageuse car l'inflammation y est très modérée et transitoire. En revanche, ce modèle demeure extrêmement intéressant pour l'étude de facteurs ou de cellules immunitaires manquants mais requis pour l'expression de leur pouvoir pathogénique dans le parenchyme nerveux.

Tant que l'on ne connaît pas le ou les antigènes reconnus par les LT CD8 au sein des lésions, la question de la présence majoritaire de LT CD8 anti-myéline ou anti-oligodendrocytaire dans le parenchyme nerveux reste donc à l'ordre du jour. Le groupe d'Aloisi prône ainsi pour une reconnaissance par les LT CD8, d'épitopes issus de virus notamment celui de l'EBV (Angelini et al., 2013).

Un autre modèle LT CD8 dépendant a été décrit dans la littérature. Ce système repose sur l'expression par les oligodendrocytes de l'antigène ovabulmine (ODC-OVA) à la surface des oligodendrocytes, sous l'induction du promoteur MBP (Na et al., 2008). Le croisement de ces souris ODC-OVA avec des souris transgéniques possédant des LT CD8 anti-OVA permet de déclencher une EAE avec des zones de démyélinisation et une infiltration de LT et de macrophages dans le SNC. Cependant, l'EAE ne se déclenche que dans les 10 premiers jours de vie de la souris, période durant laquelle seuls les LT CD8 expriment le TCR OT-1 anti-

OVA et, où la BHE n'est pas entièrement imperméable. Au-delà de cette période, le transfert de LT CD8 anti-OVA chez les souris ODC-OVA ne déclenche pas la maladie. Toutefois, l'infection simultanée avec le pathogène bactérien *Listeria* exprimant l'antigène OVA, en périphérie, permet l'activation des LT CD8 et leur migration dans le SNC. Cependant, les clones anti-OVA sont déplétés après reconnaissance spécifique avec l'antigène présent sur les oligodendrocytes (Na et al., 2012). Seule l'injection intracérébrale d'un pathogène exprimant OVA engendre une encéphalomyélite aiguë, la réponse immunitaire T CD8 anti-OVA entraînant la dégradation des oligodendrocytes (Na et al., 2012).

Ces récentes données montrent qu'une infection du SNC aide à enclencher le processus pathologique médié par les LT CD8 anti-oligodendrocytaires, dans le modèle de Na. Il semble que l'activation des TLR par des signaux viraux ou que la libération de cytokines spécifiques lors de l'infection soient déterminantes pour développer le pouvoir encéphalopathogénique des LT. Il serait intéressant de déterminer précisément la nature de ces facteurs.

Le modèle de Saxena possède des caractéristiques différentes du modèle de Na lui permettant de mieux être toléré chez l'animal. En effet, la MOG (MOG-HA) est exprimée exclusivement au niveau protéique par les oligodendrocytes au contraire de la MBP (MBP-OVA ou ODC-OVA du modèle Na) qui peut-être exprimée par les organes lymphoïdes comme au niveau des cellules mTEC impliquées dans les mécanismes de tolérance (Liu et al., 2001). De plus, la MOG est exprimée plus tardivement que la MBP (Coffey and McDermott, 1997). Les mécanismes de tolérance néonatale lorsque les LT ont accès au cerveau, avant la fermeture de la BHE, 10 jours après la naissance des souris, sont donc théoriquement absents, dans les souris DKI.

**PARTIE 3 - LA SIGNATURE MOLECULAIRE DE
L'ASTROCYTE DANS LE MODELE D'EAE MOG 35-55**

I. L'astrocyte réactif

Dans le SNC, les astrocytes possèdent une multitude de fonction. Ils sont impliqués dans la formation de synapses neuronales et dans le contrôle de l'homéostasie ionique. Grâce à leurs pieds astrocytaires recouvrant les cellules endothéliales de la BHE, ils régulent le transfert des molécules au travers de la BHE. L'astrocyte a longtemps été considéré à tort comme un "spectateur" dans les maladies du SNC, répondant à la réaction inflammatoire en s'activant (=astrogliose) et en produisant une "cicatrice" gliale. Depuis une vingtaine d'années, de nombreuses études ont démontré que l'activation des astrocytes n'était pas un phénomène secondaire passif mais un enchainement de transformation de la cellule contribuant à des effets bénéfiques ou délétères sur le SNC selon le contexte et l'effet examiné (Eddleston and Mucke, 1993).

La définition de la réactivité astrocytaire repose sur quatre critères essentiels (Sofroniew, 2009): (1) l'apparition de modifications moléculaires, cellulaires et fonctionnelles des astrocytes, en réponse à toute forme et sévérité de lésions et/ou pathologies du SNC; (2) les modifications subies par les astrocytes réactifs évoluent graduellement avec la sévérité de la lésion, avec dans un premier temps des altérations de l'expression moléculaire, puis une hypertrophie cellulaire (évolution progressive), et dans certains cas, une prolifération cellulaire pouvant être associée à la formation d'une cicatrice gliale; (3) une régulation de l'activation astrocytaire assurée par des molécules empruntant des voies de signalisation intra- et extracellulaire ; (4) la capacité de perdre ou de gagner des fonctions de façon réversible en fonction de la gravité de l'attaque.

En conséquence, la réactivité astrocytaire peut être variable tant au niveau de l'expression génique que de la morphologie cellulaire, en fonction de son degré d'activation concomitant avec le degré de sévérité de la maladie et en fonction de sa topographie (distance des lésions, zones du SNC...)

A.) Modifications morphologiques

L'altération spectaculaire de la morphologie des astrocytes a permis de mettre en évidence en premier lieu l'état de réactivité. Ainsi, une hypertrophie astrocytaire se manifeste par un élargissement des prolongements astrocytaires ainsi que du corps cellulaire. Lors de cette hypertrophie, les astrocytes surexpriment la GFAP (Sofroniew and Vinters, 2010), filament intermédiaire constituant le cytosquelette de ces cellules. L'augmentation du nombre d'astrocytes GFAP-immunopositifs et hypertrophiés définit l'astrogliose. Grâce aux différents stades d'altération morphologique associés aux différents niveaux de surexpression de la GFAP observés en condition neuropathologique, trois états de réactivité astrocytaire ont pu être définis (Figure 32).

Dans le premier, les modifications intervenant au niveau des deux paramètres définissant l'astrogliose -à savoir la surexpression de la GFAP et l'hypertrophie astrocytaire- apparaissent de façon modérée. De plus, les altérations morphologiques des corps cellulaires et des prolongements astrocytaires semblent être limitées à la sphère du domaine qui était occupé par l'astrocyte en condition physiologique (Wilhelmsson et al., 2006) sans induire, ni de recouvrements inter-domaines avec les prolongements des astrocytes voisins, ni de perte de domaine pour un astrocyte donné (Sofroniew, 2009). Dans cet état de réactivité primaire, il n'y a pas de prolifération astrocytaire. Cependant, la surexpression de la GFAP en condition neuropathologique dans les astrocytes pour lesquels cette protéine n'était pas exprimée à un niveau immunohistochimiquement détectable en condition physiologique, peut conduire à une augmentation du nombre de cellules immunomarquées, donnant la fausse impression d'une prolifération cellulaire.

Le second état de réactivité astrocytaire, plus sévère, est défini par une importante surexpression de la GFAP, une hypertrophie cellulaire marquée entraînant une extension considérable des domaines astrocytaires notamment au niveau de la substance grise. Cela a pour conséquence de provoquer des zones de recouvrement entre les prolongements des astrocytes voisins, compliquant et perturbant. Par conséquent, le traitement de l'information n'est plus pris en charge par un domaine astrocytaire donné mais par plusieurs.

Enfin, le troisième état de réactivité astrocytaire considéré comme étant très sévère est associé à la formation d'une cicatrice gliale. Cet état se caractérise par d'importantes zones de recouvrement entre les domaines astrocytaires voisins, la disparition évidente de certains de

ces domaines, une prolifération astrocytaire importante et la formation d'une cicatrice gliale compacte et dense. Cette cicatrice astrocytaire, formée en particulier à la frontière des graves lésions tissulaires, notamment lors d'un trauma de la moelle épinière, agit comme une barrière neuroprotectrice contre les cellules inflammatoires et les agents infectieux (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004; Herrmann et al., 2008; Sofroniew, 2009).

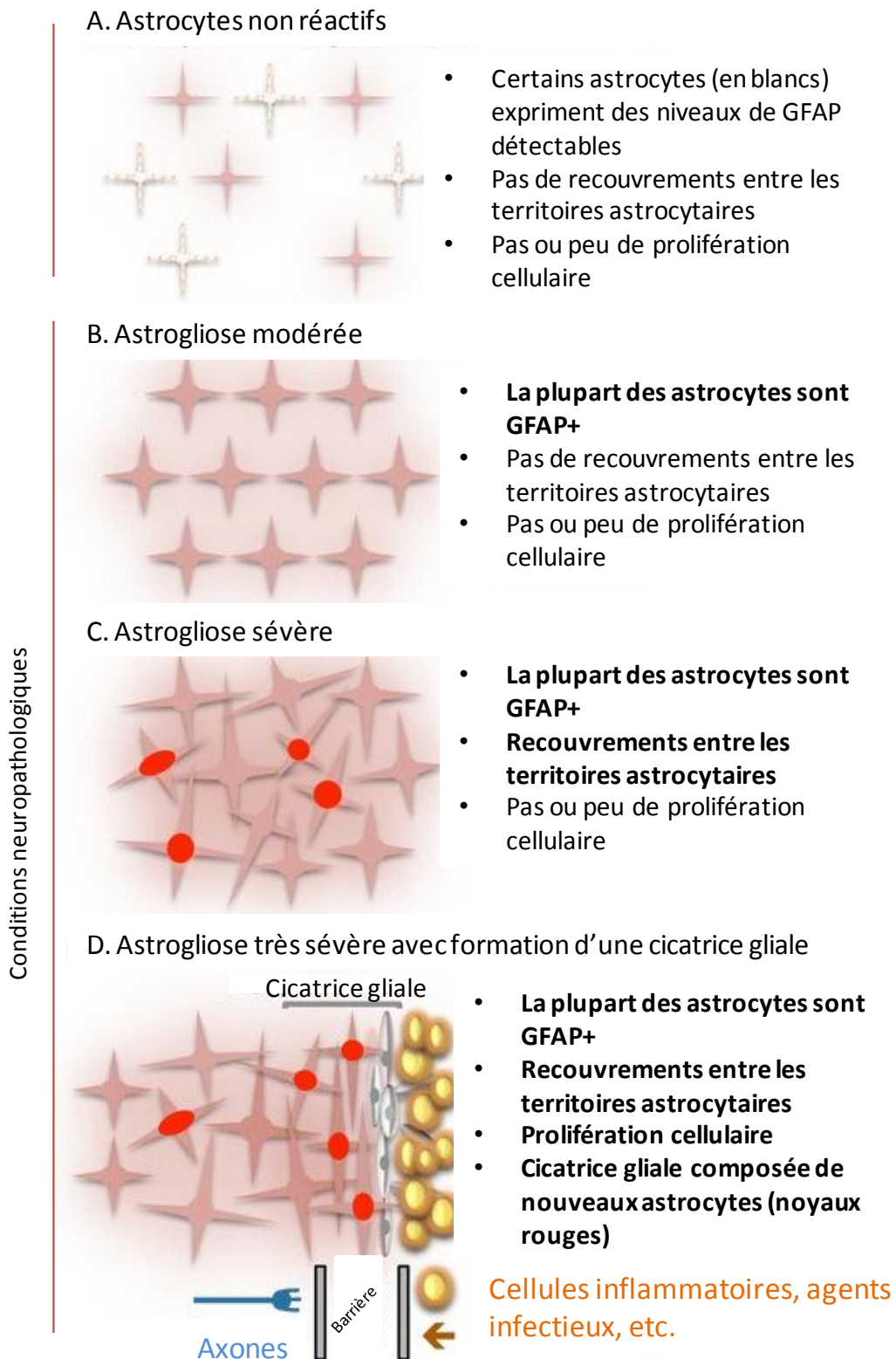


Figure 32 : Représentation des différents stades d'astrogliose

La sévérité de l'astrogliose peut être subdivisée en fonction des modifications morphologiques et phénotypiques des astrocytes. Les différents stades sont les suivants : A, Astrocytes non réactifs. B, Astrogliose modérée (premier stade). C, Astrogliose sévère (deuxième stade). D, Astrogliose très sévère et formation d'une cicatrice gliale (stade ultime) (Modifié d'après Sofroniew et al., 2010).

B.) Biochimie de l'astrocyte

De nombreuses études biochimiques ont été réalisées afin d'identifier les différentes molécules exprimées par les astrocytes réactifs. Elles ont permis de montrer que ces cellules gliales étaient capables, sous différentes conditions de stimulation *in vitro*, de produire et de libérer une grande variété de molécules effectrices intercellulaires appartenant à différentes catégories moléculaires, notamment les molécules pro-inflammatoires : cytokines, chimiokines et autres facteurs de croissance (Figure 33).

De plus, l'expression des molécules impliquées dans la structure, le métabolisme énergétique, la signalisation intracellulaire, l'attraction des cellules immunitaires ou le transport membranaire sont également modifiés dans les astrocytes réactifs (Daginakatte et al., 2008; Eddleston and Mucke, 1993; John et al., 2005; Lovatt et al., 2007; Yeh et al., 2009).

Catégories fonctionnelles	Exemple de molécules ou de familles moléculaires
Structure	Glial fibrillary acidic protein ↑, Vimentine ↑, Nestine ↑
Régulateurs transcriptionnels	NFKb ↑, STAT3 ↑, AMPc ↑, SOX9 ↑, etc
Matrice extracellulaire et interactions cellulaires	Collagènes ↑↓, Laminines ↑, Intégrines ↑, Cadhérines ↑↓, Ephrines ↑, etc
Régulateurs inflammatoires	Cytokines et facteurs de croissance ↑↓, Glutathion ↑↓
Homéostasie ionique et hydrique	Aquaporine 4 ↑↓, Transporteurs Na/K ↑↓
Recapture neurotransmetteurs extracellulaires	Transporteurs du glutamate ↑↓
Régulateurs vasculaires	Prostaglandines ↑↓, Monoxyde d'azote (NO) ↑↓
Purines et récepteurs purinergiques	ATP ↑↓, P2Y ↑↓
Stress oxydatif	NO synthase ↑↓, Super oxyde dismutase ↑↓
Protéines des jonctions gap	Connexine 43 ↑↓
Energie	Lactate ↑↓

Figure 33 : Exemple de régulation de l'expression de certaines molécules dans les astrocytes réactifs.

Les flèches ↑↓ indiquent respectivement une régulation positive et négative de l'expression. Notons que la plupart de ces familles moléculaires (comme les cytokines) peuvent avoir des membres régulés positivement et d'autres régulés négativement pour une condition donnée de réactivité, et que certaines molécules (comme le glutathion) peuvent être à la fois sur- ou sous-exprimées en fonction de l'élément déclencheur de l'astrogliose. (Modifié d'après Sofroniew, 2009).

II. L'astrocyte réactif dans la SEP

Aujourd'hui, l'évaluation de la réactivité astrocytaire dans les lésions des patients atteints de la SEP, est utilisée par les neuropathologistes pour évaluer l'activité de la lésion et apprécier son stade. De récentes études ont montré qu'il existe une réponse astrocytaire dans les lésions aiguës impliquées dans le développement et la cicatrisation de la lésion. Les

lésions actives chroniques sont composées d'astrocytes présents au pourtour de la lésion et surexprimant la GFAP alors que les lésions inactives sont composées d'astrocytes hypertrophiques exprimant faiblement la GFAP (Brosnan and Raine, 2013).

A.) Réactivité astrocytaire et déclenchement de la maladie

Plusieurs travaux dans le modèle EAE indiquent maintenant que l'astrocyte joue un rôle primaire dans l'initiation de la maladie. Le développement des techniques d'imagerie *in vivo* a permis de montrer l'activation astrocytaire précoce dans le modèle EAE. Ainsi, l'équipe de Luo a décrit, grâce à un modèle transgénique où le gène de la luciférase est spécifiquement exprimé par les astrocytes (Luo et al., 2008), que l'activation du promoteur de la GFAP apparaissait bien avant l'apparition des premiers symptômes cliniques. En effet, il y a une légère augmentation de l'activité de la luciférase dans le SNC 7 jours seulement après l'immunisation, suivie d'une forte augmentation à J9 avant le pic du score à J13.

B.) Les astrocytes et la perméabilisation de la BHE

Les astrocytes liés à la BHE sont les premières cellules à s'activer en présence de LT CD4 autoréactifs et à produire des cytokines et chimiokines pro-inflammatoires, suggérant que l'activation astrocytaire est primordiale pour l'induction de l'EAE (Kang et al., 2010).

Comme nous l'avons évoqué dans l'introduction, les astrocytes peuvent jouer un rôle essentiel dans la régulation de la perméabilité de la BHE dans la SEP et dans le modèle animal EAE. Plusieurs études montrent la complexité du processus de contrôle de la perméabilité de la BHE via les astrocytes réactifs et les mécanismes moléculaires d'action des astrocytes sont loin d'être tous connus. Les travaux d'Alvarez montrent que les astrocytes peuvent sécréter la glycoprotéine Sonic HedgeHog (SHH) qui agit sur les cellules endothéliales tout en maintenant l'intégrité de la BHE. Des expériences *in vitro* et *in vivo* chez l'animal ont montré que les astrocytes réactifs surexpriment SHH suggérant le rôle protecteur des astrocytes dans le maintien de la perméabilité de la BHE. De surcroît, une forte autoréactivité anti-SHH a été retrouvée dans les lésions des patients atteints de la SEP, après autopsie, accompagnée d'une déplétion des astrocytes périvasculaires (Alvarez et al., 2011).

A contrario du rôle bénéfique des astrocytes dans la préservation de la perméabilité de la BHE, d'autres études montrent comment l'astrocyte contribue à la perte de perméabilité de la BHE. Par exemple, en réponse à la sécrétion d'IL-1 par les macrophages retrouvés en forte quantité dans les lésions des patients atteints de la SEP (Cannella and Raine, 1995), les astrocytes surexpriment le facteur inductible d'hypoxie HIF-1 (Hypoxia-Inductible Factor-1) stimulant la production du facteur de croissance VEGF-A (Vascular-Endothelial Growth Factor) astrocytaire (Argaw et al., 2006). Celui-ci agit sur le récepteur VEGFR2/flk-1 présent sur les cellules endothéliales entraînant la diminution de la production de la Claudine-5 (CLN5) et de l'Occludine (OCLN), protéines des jonctions serrées dont l'absence influe sur l'intégrité de la BHE (Argaw et al., 2009, 2012).

C.) Régulation de l'inflammation

Les astrocytes *in vitro* ont la capacité de produire et libérer une grande variété de molécules en réponse aux différentes stimulations environnementales (Eddleston and Mucke, 1993), exerçant ainsi des effets pro- ou anti-inflammatoires sur les cellules microgliales, reconnues comme étant largement impliquées dans l'inflammation du SNC (Farina et al., 2007; Min et al., 2006). Des expériences *in vitro* montrent également que les astrocytes peuvent orienter la différenciation de LT en LT régulateurs fonctionnels après injection dans un modèle d'encéphalomyélite autoimmune expérimentale et, de fait, améliorer la maladie (Trajkovic et al., 2004).

En accord avec les données *in vitro*, de récentes études *in vivo* utilisant des modèles transgéniques indiquent que les astrocytes réactifs peuvent être considérés comme des régulateurs de l'inflammation, avec des effets pro- ou anti-inflammatoires. En ce qui concerne les effets anti-inflammatoires, ces études *in vivo* précisent qu'une atténuation de la cicatrice gliale peut avoir pour conséquence la propagation des cellules inflammatoires, non seulement au cours des réponses inflammatoires déclenchées localement à la suite d'une lésion (Bush et al., 1999; Faulkner et al., 2004; Herrmann et al., 2008; Okada et al., 2006), mais aussi au cours des réponses immunitaires adaptatives déclenchées en périphérie (Liedtke et al., 1998; Voskuhl et al., 2009). Par ailleurs, l'atténuation de la réactivité astrocytaire dans ces modèles transgéniques induit également la propagation de l'infection, lors de l'atteinte du SNC par un agent infectieux (Drögemüller et al., 2008).

Quant aux effets pro-inflammatoires, d'autres études chez la souris montrent que la suppression de certains facteurs de transcription (NFκB, STAT3) exprimés par les astrocytes réactifs peut être associée à une réduction de l'inflammation (Brambilla et al., 2005, 2009; Okada et al., 2006). Au contraire, les astrocytes réactifs pourraient être activateurs bénéfiques de l'inflammation juste après une lésion traumatique de la moelle épinière, lorsque celle-ci s'avère nécessaire à la protection de l'intégrité physique, pour ensuite limiter la propagation des cellules inflammatoires et des agents infectieux dans les tissus sains voisins, par la formation de cicatrices gliales délimitant ces zones d'inflammation (Sofroniew, 2005). Ces données suggèrent ainsi une implication des astrocytes réactifs dans la régulation de l'inflammation dans le SNC, dépendante du contexte et du stade d'évolution post-lésionnel.

L'importance des astrocytes dans la régulation de la neuroinflammation autoimmune est également démontrée par l'étude de Choi et ses collaborateurs sur l'effet du fingolimod (FTY720 : molécule thérapeutique prescrite chez les patients atteints de la SEP-RR, Gilenya®) dans un modèle d'EAE transgénique dans lequel son récepteur, le S1PR (Sphingosine-1-Phosphate Receptor), est spécifiquement délété au niveau de astrocytes. Cette étude montre qu'un des effets importants du fingolimod outre son rôle bien connu sur les cellules du système immunitaire permet de réduire la réactivité astrocytaire (Choi et al., 2011). Le fingolimod induit l'internalisation et la dégradation du S1PR, favorisant notamment la rétention lymphocytaire dans le thymus et les ganglions lymphatiques aux dépens du passage des lymphocytes dans le SNC. Les travaux de Choi et ses collaborateurs montrent que l'efficacité du fingolimod n'est peut-être pas seulement dûe à la rétention des LT dans les organes lymphoïdes secondaires mais que le fingolimod entraîne aussi un effet local anti-inflammatoire et neuroprotecteur dans le SNC. C'est pourquoi cette molécule est à l'étude pour le traitement des SEP progressives primaires (essai clinique en cours INFORMS NCT00731692, clinicaltrials.gov).

D.) L'astrocyte et les médiateurs solubles inflammatoires

Pour explorer la contribution biologique des astrocytes dans le SNC, Campbell et son équipe ont utilisé un vecteur génomique de la GFAP pour cibler l'expression de cytokines et chimiokines dans l'astrocyte (Campbell et al., 2010). Ils montrent que les astrocytes

expriment, de façon dose- et temps- dépendante, des médiateurs solubles inflammatoires en concomitance avec les réponses physiologiques rapportées chez les patients.

D'autres études utilisant le modèle de souris transgéniques inhibant l'expression du facteur NFκB spécifiquement dans les astrocytes (Brambilla et al., 2009, 2014) ont montré l'importance du NFκB astrocytaire dans la gravité de la maladie, la démyélinisation et la perte axonale, particulièrement dans la phase chronique. Chez les animaux transgéniques EAE, une baisse de TNFα et des chimiokines CCL5, CXCL9 et CXCL10 est retrouvée par rapport aux souris EAE contrôles. De plus, l'analyse immunohistochimique montre que chez les souris transgéniques, la plupart des LT retrouvés dans le SNC sont devenus a priori de type régulateur (T CD8+ CD122+). Ces résultats démontrent que l'activation de la voie astrocytaire du NFκB permet de réguler l'expression de TNFα et de chimiokines dans le SNC, tout en influençant directement sur la composition de l'infiltrat inflammatoire et sur la sévérité de la maladie. Des études *in vitro* ont aussi montré que la sécrétion de chimiokines par les astrocytes peut varier en fonction de la composition de l'infiltrat lymphocytaire. En effet, les astrocytes activés par une réponse Th17 (IL-17 et TNFα) sécrètent préférentiellement les chimiokines CXCL1, CXCL2 et CCL20 alors que les astrocytes activés par les Th1 (IFNγ et TNFα) produisent préférentiellement les chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 (Kang et al., 2010).

Un autre exemple illustre l'importance de la réactivité astrocytaire, STAT3 dépendante. STAT3 est activé par de nombreuses cytokines impliquées dans la réponse inflammatoire comme IL-6, CNTF, LIF, EGF et TGFβ (Sofroniew, 2009; Takeda et al., 1998). Dans le modèle transgénique murin où STAT3 est spécifiquement délété dans les astrocytes (Herrmann et al., 2008), la réactivité astrocytaire et la surexpression de GFAP sont atténuées au cours du trauma de la moelle épinière. Il y a une mauvaise cicatrisation des lésions, une augmentation de cellules CD45+ dans les zones autour de la lésion et de la surface de tissu nécrotique, un accroissement de la démyélinisation associé à une plus faible rémission chez l'animal. Ces données montrent que les astrocytes ont aussi un rôle bénéfique dans l'initiation, le développement et la rémission de cette pathologie.

De plus, lors de l'inflammation, les LT autoréactifs par la sécrétion de fortes quantités d'IFNγ, stimulent la production d'IL-27 par les astrocytes. L'IL-27 a été décrit comme étant un inhibiteur des cellules effectrices Th17 (Batten et al., 2006; Fitzgerald et al., 2007).

L'étude de souris transgéniques exprimant un récepteur défectueux de l'IFN γ à la surface des astrocytes, a permis de mieux comprendre l'influence de la réactivité astrocytaire IFN γ dépendante dans l'inflammation (Hindinger et al., 2012). L'inhibition de la voie IFN γ sur les astrocytes n'a pas d'effet au début de la maladie. Par contre, au pic de la maladie, une augmentation de la démyélinisation associée à la dégénérescence axonale et à une diminution de la rémission est observée. L'absence d'implication de signalisation IFN γ dans les astrocytes entraîne une modification de l'infiltrat leucocytaire associée à une diminution des cytokines IL-10 et IL-27 (cytokines régulatrices des B et T). Ces données montrent que, par cette voie, les astrocytes jouent un rôle de frein à la réponse anti-inflammatoire. Néanmoins, l'IFN γ sécrété par les LT maintient les astrocytes et la microglie dans un état réactif en augmentant leur capacité à présenter l'antigène via les molécules de CMH et donc potentiellement à maintenir la stimulation des LT.

E.) Les astrocytes et la réparation de la lésion

La mise en place d'un modèle animal pour l'étude de ce phénomène a permis d'améliorer la compréhension de ce mécanisme. Ce modèle permet de détruire les astrocytes réactifs prolifératifs grâce au système thymidine kinase/ganciclovir (Bush et al., 1999). Cela entraîne une mauvaise cicatrisation de la lésion, une augmentation de l'étendue de la réponse inflammatoire au sein de la lésion, une perte des fonctions de perméabilité de la BHE et une forte démyélinisation associée à une forte dégradation du parenchyme nerveux. La caractérisation neuroimmunopathologique de la lésion est similaire au modèle EAE GFAP-/- décrit par Liedtke (Liedtke et al., 1998). Ces propriétés de l'astrocyte peuvent être perdues dans un contexte inflammatoire.

Des études *in vitro* à partir d'astrocytes humains ont également montré que l'astrocyte est capable d'avoir un rôle bénéfique en favorisant la régénération cellulaire (Kriegstein and Alvarez-Buylla, 2009). Si les astrocytes contribuent au développement de la lésion, ils peuvent aussi jouer un rôle dans la remyélinisation (Liedtke et al., 1996). Les astrocytes des niches spécialisées où résident les cellules progénitrices de neurones comme la zone subventriculaire (Nait-Oumesmar et al., 2008), expriment des facteurs de croissance régulant la prolifération et la différenciation de cellules souches par les voies de signalisation

Jagged/Notch et Wnt (Fancy et al., 2010; John et al., 2002) ou des protéoglycanes agissant sur la migration de ces cellules (Ishii and Maeda, 2008; Sirko et al., 2007, 2010).

On retrouve également des astrocytes réactifs associés à des protéoglycanes au bord des lésions actives de la SEP (Sobel and Ahmed, 2001). Ces protéoglycanes chondroïtine-sulfates inhibent notamment la régénération axonale ; c'est pourquoi la cicatrice gliale est considérée comme délétère dans la rémission de la maladie notamment lorsque cette cicatrice gliale est trop étendue comme dans des lésions traumatiques de la moelle épinière (Fawcett, 2006). Cependant, les protéoglycanes constituent une barrière qui pourrait restreindre la dégénérescence induite par les forts taux extracellulaires de molécules toxiques (Roitbak and Syková, 1999).

F.) Les astrocytes et la neurotoxicité

Les astrocytes réactifs peuvent échanger leurs fonctions neuroprotectives en fonctions neurotoxiques dans les maladies neurodégénératives. L'astrocyte dans les conditions normales est clairement impliqué dans la protection en recapturant des neurotransmetteurs ou en produisant le glutathion qui agit contre le stress oxydatif (Sofroniew, 2009). Leur capacité à capturer le neurotransmetteur glutamate extracellulaire toxique en forte concentration pour les neurones est assurée par les transporteurs GLAST-1 (EAAT1) ou GLT-1 (EAAT2). Les souris déficientes en GLT-1 accumulent le glutamate dans le milieu extracellulaire entraînant une toxicité cellulaire (Tanaka et al., 1997). Lorsque les astrocytes deviennent réactifs, ils perdent graduellement l'expression de ces transporteurs au neurotransmetteur glutamate (Howland et al., 2002).

Les astrocytes activés peuvent également sécréter des substances cytotoxiques pour les neurones et les cellules du SNC, comme les radicaux d'Oxyde Nitrique (NO) et les dérivés oxydatifs de l'oxygène (ROS) (Hamby and Sofroniew, 2010).

Un autre facteur, surexprimé par les astrocytes réactifs, peut être impliqué dans la pathogénèse de la maladie : Lcn2 (lipocaline-2) (Lee et al., 2009). Des travaux, *in vitro*, montrent que Lcn2 favorise la déramification des cellules microgliales et la polarisation des astrocytes (Jang et al., 2013; Lee et al., 2009). Une étude menée sur le cancer du sein a mis en évidence que Lcn2 stimule la voie TWEAK-TWEAKR en augmentant l'expression de

TWEAK-R favorisant ainsi la régulation de l'invasion de cellules cancéreuses (Gaudineau et al., 2012). Or, il a été démontré, *in vitro*, que les astrocytes se réactivent suite à la stimulation via le TWEAK (Saas et al., 2000).

Comme pour les cellules immunitaires (Th vs. Tregs) et la microglie (profils M1 versus M2), toutes ces études indiquent que la réactivité astrocytaire peut avoir des effets bénéfiques ou délétères selon la population cible et l'environnement inflammatoire. La notion d'hétérogénéité astrocytaire, voire même de signatures moléculaires de l'astrocyte réactif a été mis récemment sur le devant de la scène (Zamanian et al., 2012). C'est ce que nous aborderons dans le dernier chapitre.

III. Analyse de la signature moléculaire de l'astrocyte

Les études menées durant ces dernières années s'accordent sur le fait que l'astrocyte est impliqué dans de multiples interactions avec les autres cellules du SNC. A ce jour, la fonction des astrocytes reste encore imprécise notamment dans la physiopathologie de la SEP. Il est primordial de mettre à profit des méthodes d'analyse fine *in situ* afin de déterminer la signature moléculaire de l'astrocyte réactif dans cette pathologie. Très récemment, l'isolation et la purification de certains types d'astrocytes ont permis de réaliser le transcriptome de l'astrocyte réactif dans certaines pathologies. Gu et collaborateurs ont montré l'impact de la réactivité astrocytaire en culture en présence de microglie ou dans un modèle animal transgénique de la maladie de Parkinson. L'astrocyte réactif sécrète de l' α -synucléine, toxique pour les neurones, et contribue à l'activation de la microglie (Gu et al., 2010). L'astrocyte réactif est aussi impliqué dans la pathogénèse d'autres maladies neurologiques telles que la maladie d'Alzheimer (Simpson et al., 2011) ou le syndrome d'Aicardi-Goutières (van Heteren et al., 2008).

A.) Différentes approches pour étudier la réactivité des astrocytes

a.) Analyses par immunohistochimie et hybridation *in situ*

Les premières études concernant la réactivité astrocytaire ont été réalisées sur coupe de SNC avec l'étude de deux ou trois marqueurs par coupe par immunohistochimie ou

hybridation *in situ*, ce qui limite le nombre de marqueurs par étude. Au cours de ces dernières années, cette technique a été supplantée ou complétée par les analyses *in vitro* et les analyses *ex vivo* à l’échelon moléculaire. Cependant, ces approches histologiques restent très utilisées pour la visualisation de marqueurs importants révélés par les nouvelles technologies et l’identification de leur source cellulaire ou de leurs cibles.

b.) Culture *in vitro* d’astrocytes

Des cultures primaires d’astrocytes préparées le plus souvent à partir de cerveau murin néonatal, ont permis d’obtenir un premier profil de l’astrocyte (Bachoo et al., 2004; McCarthy and de Vellis, 1980). Les cultures d’astrocytes sont dérivées à partir de cellules précurseurs astrogliales maturées en présence de sérum ou de facteurs de croissance. Cependant, tous les gènes exprimés dans l’astrocyte en condition de base *in vivo* ne sont pas retrouvés dans les astrocytes en culture et inversement, ils présentent aussi certaines caractéristiques de l’astrocyte réactif (Cahoy et al., 2008). Les résultats obtenus à partir de cultures cellulaires doivent donc être pris avec précaution et confirmés *ex vivo* pour leur attribuer une signification fonctionnelle.

c.) Isolation par cytométrie de flux

L’équipe de B. Barres a décrit en 2008 une méthode permettant d’isoler les astrocytes corticaux (de la substance grise) par cytométrie de flux (Cahoy et al., 2008). Pour cela, des souris transgéniques exprimant spécifiquement une protéine fluorescente (Enhanced Green Fluorescent Protein eGFP) par les astrocytes (sous la dépendance du promoteur du gène S100b) ont été utilisées. Le marqueur classique GFAP a été écarté car celui-ci est plus exprimé dans les astrocytes de la substance blanche que dans ceux de la substance grise et son expression varie en fonction de l’activation de l’astrocyte (Bushong et al., 2002). Par contre, le marqueur S100b a été sélectionné car il est présent dans tous les types d’astrocytes. Cependant, même si tous les astrocytes expriment la eGFP sous dépendance du promoteur S100b, seuls les astrocytes protoplasmiques de la substance grise peuvent être isolés par cytométrie de flux. La dissociation des astrocytes de la substance blanche est techniquement inadaptée et elle entraîne de fait la mort des cellules. Après dissociation du tissu, les astrocytes corticaux (eGFP+) ont été isolés par FACS pour faire une étude transcriptomique (Cahoy et al., 2008)

d.) Isolation par microdissection

La microdissection laser est un nouvel outil de recherche permettant l'isolation rapide des populations cellulaires sélectionnées à partir de tissus complexes comme le cerveau. En combinant cette technique avec de la qPCR, une analyse du transcriptome des cellules peut être réalisée. Cette technique a déjà permis d'analyser l'expression génique de cellules nerveuses comme les neurones dans la maladie d'Alzheimer (Liang et al., 2008) et dans son modèle animal (Vincent et al., 2002); les neurones moteurs dans le modèle animal de la sclérose amyotrophique latérale (Ferraiuolo et al., 2007) ou dans les cerveaux de patients schizophréniques (Harris et al., 2008). Récemment, une étude a été réalisée sur la moelle épinière des patients ayant eu une SEP progressive, à partir de régions lésionnelles issues des périplaques entourant les lésions totalement démyélinisées (Lieury et al., 2014). L'analyse transcriptomique des lésions identifie l'implication de gènes pro- et anti-inflammatoires caractéristiques d'une inflammation lente et chronique.

Seules quelques équipes dans le monde ont utilisé cette technique pour l'astrocyte. Ordway et collaborateurs ont caractérisé différents types cellulaires du cerveau humain tels que les astrocytes, les neurones et les oligodendrocytes (Ordway et al., 2009). Une équipe anglaise a comparé les astrocytes réactifs issus de cerveaux de patients Alzheimer en fonction de la durée de la maladie montrant que l'expression de gènes associés au cytosquelette et aux voies de signalisation intracellulaire était altérée chez les patients avec une maladie très avancée en corrélation avec la présence de l'allèle Apoε4 dans l'évolution de la maladie (Simpson et al., 2011).

En 2012, l'équipe de Ben Barres a décrit le profil de l'astrocyte réactif dans deux modèles murins d'atteinte du SNC : accident vasculaire cérébral (ischémie) ou neuroinflammation induite par le LPS (Zamanian et al., 2012). Ils ont identifié un certain nombre de gènes induits dans l'astrocyte réactif dans les deux situations comme *Lcn2* et d'autres gènes plutôt induits préférentiellement dans le 1er ou le 2e modèle, mettant en exergue la notion d'hétérogénéité de l'astrocyte réactif à l'échelon moléculaire.

B.) Mise en évidence d'un profil transcriptomique de la réactivité astrocytaire dans le modèle EAE

Le but de notre étude est de faire l'analyse de la réactivité astrocytaire dans le modèle EAE classique. A contrario des modèles animaux dans lesquels la réactivité astrocytaire a été étudiée, c'est l'astrocyte de la substance blanche de la moelle épinière qui est essentiellement affecté dans le modèle EAE classique ascendant. La purification par FACS des astrocytes *ex vivo* n'étant pas possible, la technique de microdissection laser s'est imposée comme alternative. Les principaux résultats issus de ce travail sont présentés dans le manuscrit en anglais ci-joint (en cours de soumission). Les mises au point importantes à la réalisation de ce travail sont présentées ci-dessous.

a.) Mise au point du protocole de microdissection laser

1.) Optimisation du temps de marquage des lames

Pour identifier spécifiquement l'astrocyte réactif dans les zones infiltrées EAE, nous avons réalisé un double marquage immunofluorescent avec des anticorps anti-GFAP et un marquage des LT pour repérer les zones infiltrées. La technique de marquage immunohistochimique utilisée classiquement n'est pas adaptée pour notre étude du transcriptome après microdissection laser. En effet, les longues étapes d'incubation dans des solutions aqueuses entraînent une rapide dégradation des ARN. Il a fallu optimiser le processus de marquage (<30 minutes) pour préserver l'intégrité de l'ARN (Fend et al., 1999; Gjerdrum et al., 2004).

2.) Immunomarquage pour la microdissection laser

Des cryocoupes de 12µm de SNC ont été utilisées. Deux techniques de préservation de l'ARN ont été testées en complétant chaque tampon d'incubation et de lavage avec soit un inhibiteur des RNases (Protector RNase Inhibitor, 03 335 402, Roche) ou soit en augmentant la concentration saline avec 2M de NaCl. La première étape est la pré-incubation en présence de PBS, de 30% NDS durant 5 minutes, suivie d'une étape de marquage avec les anticorps primaires anti-GFAP de lapin et anti-CD3 de rat (tableau B) de 10 minutes dans une solution de PBS, 3% NDS. Deux lavages successifs d'une minute sont effectués en milieu PBS. Les coupes sont ensuite incubées pendant 10 minutes avec les anticorps secondaires

anti-IgG de rat couplés au DL594 et anti- IgG de lapin couplés au DL488 (tableau B) dans du PBS, 3% NDS, puis lavées deux fois avec du PBS. Enfin, les coupes sont déshydratées grâce à un bain de quelques secondes dans de l'éthanol 70% et à un deuxième bain d'éthanol 100%.

Après le marquage, l'ARN est directement extrait grâce au kit RNeasy Micro Kit (Qiagen 74004). La qualité de l'ARN est confirmée grâce à un électrophorégramme obtenu suite à la migration de l'ARN dans une puce spécialisée (RNA pico labChip, Agilent Technologies) et analysée avec le bioanalyseur 2100 Agilent (Agilent Technologies). Ainsi, le RIN (RNA Integrity Number) et le ratio 28/18S vont être déterminés. Le RIN est une échelle allant de 1 à 10 où 1 correspond à un ARN de mauvaise qualité et 10 à un ARN non dégradé. Le ratio 28/18S lui doit être idéalement compris entre 1,8 et 2 pour des cultures cellulaires ; cependant, nous avons toléré une baisse de ce ratio au vue de la technique et du calcul automatique du rapport alors que la population d'ARNm du SNC est plus complexe (avec un étalement des ARNm autour du 28s notamment).

Les résultats obtenus après un marquage en présence d'un inhibiteur de RNase montrent qu'il y a eu une forte dégradation de l'ARN, le ratio 28/18s diminue fortement et la présence de multiples fragments d'ARN montre que celui-ci a été dégradé (Figure 34 a.). L'ajout de NaCl à forte dose permet de protéger l'ARN de cette dégradation. Les bandes 18 et 28S sont bien visibles et séparées, le ratio 28/18S est 1,6 et le RIN de 7,6 +/- 0,6 (Figure 34 b.).

Dans nos mains, l'ajout d'un inhibiteur chimique des RNases aux solutions aqueuses durant les différentes phases de marquages est insuffisant pour préserver l'ARN. Nous avons confirmé le bénéfice de l'ajout de NaCl (2 M) aux solutions utilisées dans le protocole pour permettre une meilleure conservation de l'ARN (Brown and Smith, 2009)

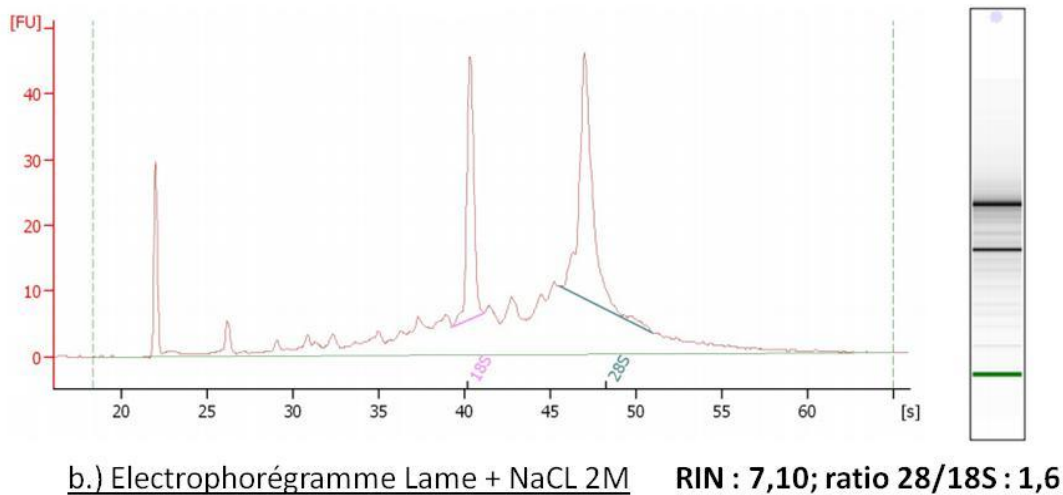
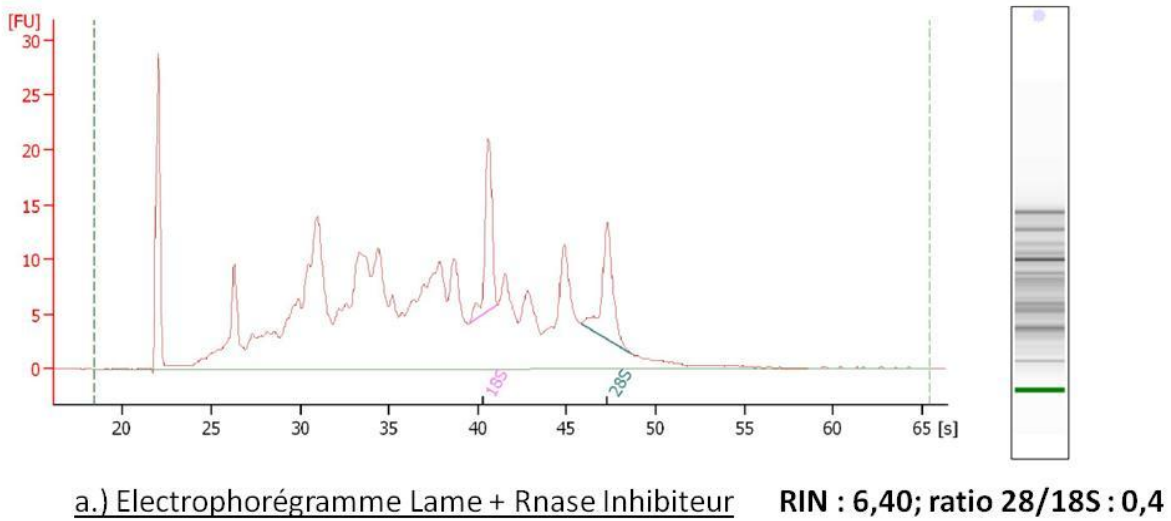


Figure 34 : Intégrité de l'ARN en fonction des additifs utilisés lors du protocole de marquage

Electrophorégramme d'ARN d'astrocytes isolés à partir de coupes de SNC ayant été marqués par un protocole contenant a.) des inhibiteurs de Rnase ou b.) une forte concentration en sels. Le bioanalyseur Agilent a permis de déterminer le RIN et le ratio 28/18S pour les deux échantillons.

3.) Microdissection des astrocytes

Les astrocytes ainsi que les LT sont marqués avec anticorps anti-GFAP et anti-CD3 respectivement. La microscopie fluorescente de notre microdissecteur permet d'observer qu'un fluorochrome à la fois. C'est pourquoi dans un premier temps, tous les LT marqués en rouge grâce à l'anticorps secondaire anti-IgG de rat DL 594 ont été anotés. Ensuite, les astrocytes vont être visualisés grâce à l'anticorps secondaire anti-IgG de lapin DL488. Les

astrocytes de la substance blanche et à proximité des LT vont être délimités en évitant toute insertion au sein des zones de microdissection de LT. Après microdissection, les astrocytes d’intérêt ont été capturés et récupérés dans le capuchon du tube de récolte (Figure 35).

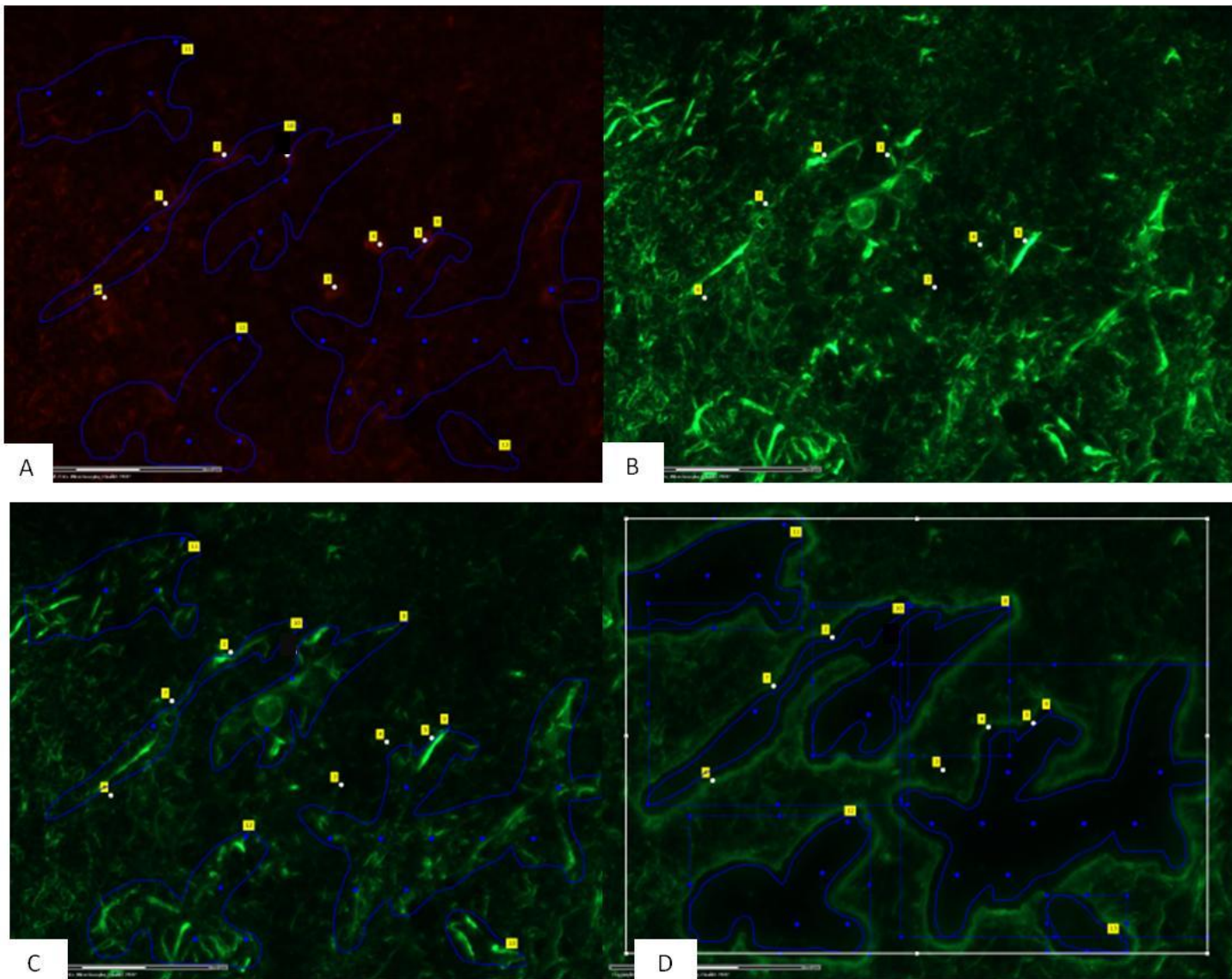


Figure 35 : Exemple de microdissection des astrocytes au niveau de zones T infiltrées de la substance blanche de la moelle épinière.

Protocole de sélection et de microdissection des astrocytes d’intérêts en microscopie à fluorescence (X40). Premièrement, les LT (anti-CD3 en rouge) sont repérés dans le SNC et identifiés (A) ensuite les astrocytes (anti-GFAP en vert) de la substance sont visualisés (B) et identifiés par des zones bleues, à proximité des zones infiltrées (C). Après microdissection, les astrocytes d’intérêts ont été disséqués et catapultés dans le tube (D)

4.) Choix des lames utilisées et mode de récupération des astrocytes capturés

Afin d'optimiser au maximum la qualité de notre ARN, deux types de lames ont été testées ainsi que deux modes de récupération des astrocytes catapultés. Tout d'abord, nous avons comparé les bénéfices : des lames SuperFrost (ThermoScientific) permettant une adhésion des cellules directement sur lame de verre versus les lames PET à membrane (polyéthylène téréphtalate, ZEISS) permettant une adhésion des cellules sur cette membrane. Lors de la microdissection, la membrane va être découpée et catapultée en même temps que la cellule, cette action va favoriser l'intégrité de la cellule. Pour la visualisation des marquages fluorescents, les résultats obtenus sont les mêmes pour les deux lames.

Lors de la microdissection, la lame PET avec membrane permet de réduire le nombre d'impact du laser pour catapulter les zones à découper. Une fois les zones catapultées, deux types de « récepteurs » sont utilisés : un capuchon en silicone favorisant l'adhésion et la conservation des cellules ou un capuchon rempli d'une solution de guanidium (agent chaotropique permettant l'éclatement des cellules et dénaturant permettant l'inactivation des Rnases) contenant du β -mercaptoéthanol (agent réducteur dénaturant les Rnases). Les différentes conditions ont été testées en parallèle à partir de 1 500 000 μm^2 d'astrocytes microdisséqués. L'ARN a été directement extrait et analysé selon des conditions décrites précédemment.

Les résultats obtenus montrent que les conditions de découpe au laser et de catapultage sur lames de verre n'ont pas permis pas de récupérer l'ARN. Seul le protocole de récupération directe des astrocytes dans leur tampon de lyse à partir des lames PET permet d'obtenir un profil idéal de deux bandes 28/18S semblables à la condition réalisée à partir d'ARN extraits directement d'une coupe de SNC. Par conséquent, nous avons opté pour les coupes collées sur des lames PET et pour les cellules directement récupérées dans le tampon de lyse (Figure 36).

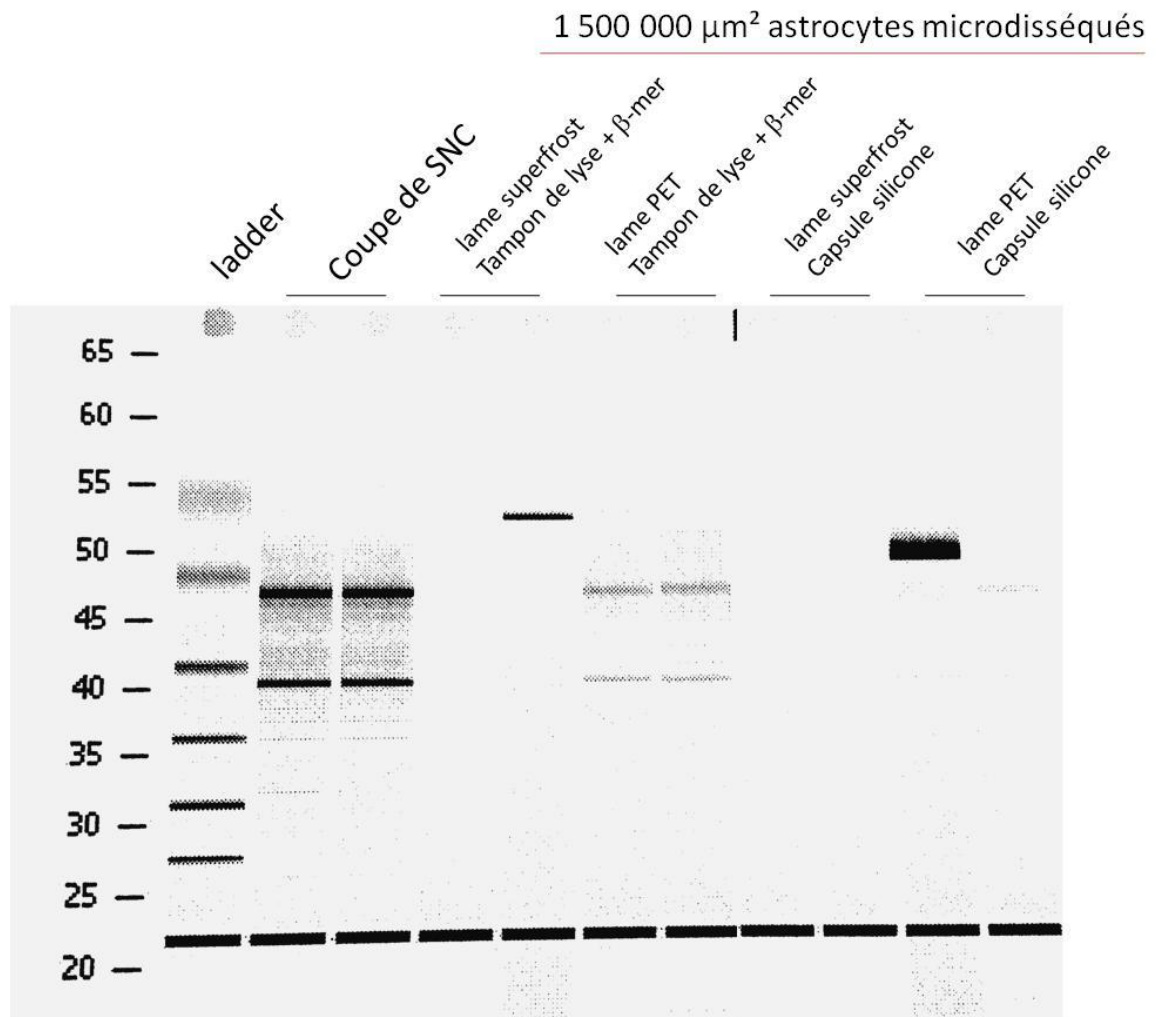


Figure 36 : La capture d'astrocytes fixés sur lame PET dans une capsule remplie de tampon de lyse permet de favoriser la récupération d'ARN intègres

Gel d'électrophorèse des ARNs. Le marqueur de taille standard issu du kit Pico Agilent est visible à gauche. Chaque échantillon correspond à la migration d'ARN issus de 1 500 000 μm^2 d'astrocytes microdisséqués et capturés selon différentes conditions : lame PET/tampon de lyse ; lame PET/Capsule silicone ; lame superFrost/tampon de lyse ; lame superFrost/Capsule silicone.

b.) Résultats : Article en soumission

Selected gene expression profiling of laser-microdissected white matter astrocytes reveals their reactive signature and high estrogen sulfotransferase expression during autoimmune neuroinflammation.

Flora Guillot^{1,2}, Alexandra Garcia^{1,2}, Marion Salou^{1,2}, Jean-Paul Soulillou^{1,2}, Sophie Brouard^{1,2,3}, David A Laplaud^{1,2,4}, Arnaud B Nicot^{1,2,+}

1 INSERM UMR1064/CRTI, Nantes, France

2 Université de Nantes, Faculté de Médecine, Nantes, France

3 CESTI/ITUN, CHU Nantes, France

4 Service de neurologie, CHU de Nantes, France

+ To whom correspondence should be addressed: Arnaud Nicot Ph.D, INSERM UMR 1064, CHU Hôtel-Dieu, 30 Bd Jean Monnet, 44093 Nantes cedex, France Email: arnaud.nicot@inserm.fr. Tel: 02 40 08 74 10

ABSTRACT

Background. Astrocytes, the most abundant cell population in mammal CNS, contribute to a variety of functions including homeostasis, metabolism, synapse formation and myelin maintenance. White matter (WM) reactive astrocytes are important players in amplifying autoimmune demyelination. Reactive astrocytes may exhibit different changes in transcriptome profiles and cell function in a disease-context dependent manner. However, their transcriptomic profile has not been yet defined because they are difficult to purify in contrast to grey matter astrocytes. Here, we isolated WM reactive astrocytes by laser capture microdissection in a murine model of multiple sclerosis to better define their molecular profile focusing on selected genes related to inflammation. Because estrogens have anti-inflammatory effects on astrocytes only at high nanomolar concentrations *in vitro* and *in vivo*, we also examined the expression of enzymes implicated in estrogen inactivation.

Methods. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) was induced in female C57BL6 mice with MOG 35-55 immunization. FACS analysis of a portion of individual spinal cords at peak disease was used to assess the composition of immune cell infiltrates. Parallely, using custom Taqman-low-density-array (TLDA), we analyzed mRNA expression of 40 selected genes from immuno-labeled laser-microdissected astrocytes ($5.10^6 \mu\text{m}^2/\text{mouse}$) obtained from fresh-frozen lumbar spinal cord sections of EAE and control mice. Immunohistochemistry on paraformaldehyde-perfused EAE and control spinal cord was used to confirm protein expression in astrocytes.

Results. FACS analysis confirmed the presence of T cells (mainly effector/memory T CD4+ cells) and macrophages in EAE spinal cords. TLDA-based gene expression astrocytic profiling identified EAE-induced expression of mRNA encoding proinflammatory cytokines including chemokines (CCL2/5/7

and CXCL9/10/16) as well as new genes recently described to be expressed by cortical grey matter reactive astrocytes in other animal models of CNS disease. Strikingly, SULT1A1 but not other members of the same family, was highly expressed in WM spinal cord astrocytes and further increased in EAE. Immunohistochemistry on spinal cord tissues confirmed the selective protein expression of this enzyme in white matter astrocytic processes.

Conclusions. We here described for the first time the mRNA expression of several genes in white matter astrocytes in a mouse model of multiple sclerosis. Among the selected genes, besides expected proinflammatory chemokines and inflammatory mediators, we evidenced relative high astrocytic expression levels of the cytoplasmic enzyme SULT1A1 that may be used as an immunohistochemistry marker for this population. As the sulfation activity of SULT1A1 inactivate estrogens, its high astrocytic expression may account for the relative resistance to anti-neuroinflammatory effects of estrogens, previously reported in EAE or multiple sclerosis. Blocking the activity of this enzyme during neuroinflammation may help the CNS to maintain the anti-inflammatory activity of endogenous estrogens or limit the dose of estrogen regimen for therapeutical purposes.

Keywords: multiple sclerosis, fibrous astrocyte, radial glia, astrogliosis, estrogen metabolism.

BACKGROUND

Astrocytes are situated in key positions between microvessels, axons and oligodendrocytes where they participate to a wide range of functions during brain construction and maintenance, exchanging signals with the neuronal compartment at the synapse, maintaining low extracellular glutamate level preventing chronic glutamate excitotoxicity, and supplying substrates for energy metabolism to neurons and oligodendrocytes (Baumann and Pham-Dinh, 2001; Farina et al., 2007). Astrocytes have also the potential to secrete a variety of signalling molecules including growth factors for neurones and oligodendrocytes, immune modulators, metalloproteases and nitric oxide depending on cellular context (Ishibashi et al., 2006). They may also play an important role for securing the immune privilege of the CNS (Aloisi et al., 2000). Injury, inflammation or degenerative disease in the central nervous system (CNS) is accompanied by alterations in the morphology of astrocytes, the most numerous population of CNS glia. This response is referred to as reactive astrogliosis (Ridet et al., 1997). The positive effect of the astrogliotic response was initially illustrated using mice in which reactive proliferative astrocytes were selectively targeted for ablation in the injured CNS (Farina et al., 2007). On the other hand, the detrimental role of reactive astrocytes involving NFkB signaling was clearly demonstrated in *in vivo* models of neuroinflammation, indicating they have a key role in the local inflammatory response and in remyelination ((Brambilla et al., 2009). Thus, in addition to axonal damage and demyelination, astrocytic activation is a central pathological feature that likely contributes to multiple sclerosis progression, in relapsing-remitting as well as in progressive forms with low grade inflammation (Lieury et al., 2014). Previous studies using transcriptomics of EAE and MS lesions have provided important insights in the pathogenesis and potential new targets for therapy (Lock et al., 2002) (Han et al., 2008; Nicot et al., 2003; Steinman and Zamvil, 2003). Comparing the transcriptomes of whole CNS tissues is a useful strategy for pinpointing specific alterations in CNS diseases. This approach needs however to be completed by histological approaches to localize the cellular source of identified molecules and their potential targets. Thus, one factor limiting the interpretation of tissue-based omic data is the lack of cell-type purity. Laser capture microdissection (LCM) following immunolabeling has been shown to be useful for overcoming this limitation (Emmert-Buck et al., 1996). Direct mRNA profiling for a single cell population from frozen brain tissue slices is now possible. We here applied this strategy to characterize the molecular profile of white matter astrocytes in EAE spinal cord. This approach is especially needed for this astrocyte population because it cannot be purified by

flow cytometry based methods in contrast to cortical grey matter astrocytes (Cahoy et al., 2008). Indeed, the use of astrocyte specific GFP transgenic mice and FACS analysis has facilitated the gene profiling of cortical astrocytes in two animal models of CNS injury (Zamanian et al., 2012). Similarly, a better identification of the molecular signature of reactive white matter astrocytes in CNS tissue infiltrated by immune cells is a prerequisite for further designing *in vitro* and *in vivo* experiments in order to better understand the contribution of astrocytes in multiple sclerosis physiopathology. Using a murine model of multiple sclerosis, experimental autoimmune encephalomyelitis, we here employed laser captured microdissected (LCM) astrocytes from spinal cord fresh-frozen sections to determine transcript expression levels of various genes that have been recently highlighted in normal (Cahoy et al., 2008) or reactive (Zamanian et al., 2012) grey matter astrocytes. Whereas low levels of endogenous estrogen prevent microglial hyperreactivity (Vegeto et al., 2006), we and others have found that only high nanomolar levels of estrogen are able *in vivo* to dampen ongoing EAE and neuroinflammation *in vivo* as well as *in vitro* to reduce astrocytic proinflammatory cytokines or chemokines *in vitro* (Giraud et al., 2010a). We thus also examined the expression of sulfotransferases and glucuronidases, cytoplasmic enzymes involved in estrogen inactivation by conjugation (Raftogianis et al., 2000).

MATERIALS AND METHODS

Induction of active EAE. Three adult female mice (8 weeks old, Janvier Labs, France) were immunized s.c. at the base of the tail and lower flanks with 200 µg of MOG 35-55 peptide (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK, purity >85%, Genecust Europe, France) in phosphate buffer saline (PBS) emulsified with an equal part of complete Freund's adjuvant (CFA) supplemented with Mycobacterium tuberculosis H37Ra at 6 mg/ml (Difco Laboratories, Detroit, MI) as previously described (Gourdain et al., 2012). Three control mice were s.c. injected with adjuvant/PBS. Mice received in addition 300 ng of pertussis toxin injected intraperitoneally (i.p.) on days 0 and 2 (Calbiochem, Darmstadt, Germany). Mice were scored daily for clinical signs of disease according to the 0-5 scale: 0, no detectable signs; 1, complete limp tail; 2, limp tail with unilateral hindlimb paralysis; 3, bilateral hindlimb paralysis; 4, bilateral hindlimb paralysis and forelimb weakness (end point). At peak eae (score 3-4, day post-onset 5-6), mice were anesthetized with thiopental and intracardiacally

perfused with cold PBS. Spinal cords were flushed. The lumbar part was snap-frozen in embedded in Tissue-Tek® optimal cutting temperature (OCT) with dry ice and stored at -80°C and placed at -20/25C before used for LCM. The rest of the spinal cord was used for FACS analysis.

Assessment of spinal cord immune infiltrate by FACS analysis. Immune cell infiltrates were evaluated in individual spinal cords according to the method adapted from Lipton *et al* (2005). Spinal cord was dilacerated and digested in buffer HBBS, collagenase D (1mg/ml), DNase I (1mg/ml) and MgCl₂. Cells was dissociated and filtered on 100 µm and 70 µm. Cells was incubated with fluorescent antibody anti-CD45.2 APC-Cy7 (BD 560694), anti-CD11b APC (BD 553312), anti-CD3 FITC (BD 553062), anti CD4 A700 (BD 557956), anti-CD8 PE-Cy7 (BD 552877), anti-B220 PE (BD 553090), anti-CD44 A700 (BD 560567) and anti-CD62L PerCP-Cy5.5 (BD 560513) during 15 minutes at 4°C. Next, cells were permeabilised and the nucleus of cells were labeled with DAPI for gating immune cells and microglia during FACS analysis.

Preparation and staining of frozen sections for LCM. Twelve µm spinal cord sections were prepared using a Leica cryostat at -17/18°C and thawed onto glass slides covered with a thin biochemically inert membrane (MembraneSlide 0.17 PET, Zeiss, Germany). After quick drying at room temperature, the sections were fixed in 100% ethanol, blocked for 5 min at room temperature in 0.01M phosphate buffer containing 2M NaCl (high PBS), 25% Normal Donkey Serum and 0.1 % Triton-X100. Sections were then incubated with primary antibodies rabbit anti-GFAP (1/50, DakoCytomation, Glostrup, Denmark) and rat anti-mouse CD3e (1/10, BD Pharmingen) in high PBS with 2.5% NDS for 10 min. After 3 min washings with high PBS, sections were incubated with secondary antibodies (1/50) in high PBS and 2.5% NDS for 10 min. The AF488-coupled F(ab')₂ secondary (anti-rabbit IgG) and Rhodamine Red-X coupled F(ab')₂ secondary (anti-rat IgG) from Jackson ImmunoResearch (Suffolk, England) were used. After 3 min washings with high PBS, sections were dipped in 70% ethanol for 1-3 seconds and dehydrated in 100% ethanol.

Laser capture microdissection (LCM) and RNA extraction. PET-coated slides were placed face up dried directly after staining, and a 0.2-ml Eppendorf tube cap was placed on the dedicated tubing rack of the UV laser microdissection PALM Microbeam (Carl Zeiss, Germany). Samples were processed within 2 h with LCM settings as follow: cut energy, 41; cut focus 82; LPC energy delta, LPC focus delta 2; and 20 µm spot distances. After stamping CD3-immunolabeled cells at x40 objective under Zeiss 43HE filter set to localize T cell infiltrated zones in the EAE white matter, contours of GFAP-labeled astrocytes were

carefully drawn at x 40 objective using Zeiss 38HE filter set (Figure 1A-B). White matter GFAP-labeled astrocytes from control mice were directly selected under the 38HE filter set. At the end of the drawings, astrocytes were microdissected and catapulted in the 0.2 ml Eppendorf tube cap filled with RLT lysis buffer (RNeasy Micro kit, Qiagen, Hilden, Germany) containing 1% beta-mercaptoethanol. For each mouse, $\sim 5 \cdot 10^6 \mu\text{m}^2$ of pooled astrocytes were then extracted for total RNA and Dnase I treated with RNeasy Micro kit. RNA quantity and integrity were evaluated using the 2100-Bioanalyzer with the RNA 6000 Pico kit (Agilent Technologies). Astrocyte samples (corresponding to 4000-6000 cells) gave 5-7 ng RNA. To analyse more than a few genes, a preamplification step was thus required. TLDA after preamplification of LCM samples have been shown to be highly sensitive and reproducible (Demarest et al., 2012). The cDNA was thus synthesized and amplified with the CellAmp Whole Transcriptome Amplification Kit (#TAK3734Z, Takara, Japan).

TaqMan arrays (TLDA). Custom-made Taqman array 96 well plates (Life Technologies, Foster City, CA, USA) were used for gene expression profiling based on qPCR to compare EAE reactive astrocytes from control astrocytes. The list of genes and corresponding probes is presented in Table 1. The Taqman array plates were loaded with the sample-specific PCR mix containing the template cDNA, TaqMan Universal PCR Master Mix and water to form the reaction mix as indicated by the provider. Then, the plates were centrifuged with two consecutive 1-min spins to ensure complete distribution of the sample specific PCR reaction mix. The plate was sealed and introduced into Vii7 Real Time PCR system (Applied Biosystem/Life Technologies, Foster City, CA, USA) with 40 PCR cycles and according to recommended thermal cycling conditions for microfluidic cards. To detect expression signals at the maximum sensitivity, Ct readings were obtained using a DRn threshold of 0.04, ensuring this was in the log-linear range of exponential amplification for each gene and at least 10-fold above background levels. We rated a Ct value of <38 as negative (below detection level), 38-36 as very poor, 35-30 as poor, and <30 as good. The relative expression of each transcript was measured using the $2^{-\text{ddCt}}$ method (Livak et al., 2001); the geometric mean of Ct values of the best reference genes (according to Vandesompele et al., 2002), alpha-tubulin 1A (TUB1A1) and peptidylprolylisomerase A (PPIA, cyclophilin A) (Figure 1C), was used for normalization of gene expression levels and calculation of dCt values. Values are expressed as mean \pm SEM. Data were analyzed using Excel and GraphPad Prism software 5.0 using Mann-Whitney test. Differences were considered statistically significant if the P-value was <0.05.

Immunocytochemistry on spinal cord sections. Archival coronal spinal cord sections from paraformaldehyde-perfused mice (Giraud et al., 2010a) kept at -15C were used for SULT1A1 and GFAP immunolabeling. Primary antibodies were rat anti-GFAP (1/200, #345860, Merck Millipore, Darmstadt, Germany) and rabbit anti-mouse SULT1A1 (1/500; Bioss, Woburn, MA) revealed with donkey AF488- or AF594-coupled F(ab')₂ anti-rat or anti rabbit IgG (1:1500; Jackson ImmunoResearch, Suffolk, England). Sections were incubated with DAPI at 1 µg/ml for 5 min, rinsed and coverslipped with anti-fading mounting medium (Mowiol/DABCO). A Negative control where primary antibodies were omitted was included. Spinal cord sections were analyzed on a fluorescent microscope using appropriate filters (BX61, Olympus, Melville, NY, USA) and pictures were taken at x 40 magnification using a digital camera (DP 50, Olympus) connected to an image-acquisition software (Analysis, Olympus).

RESULTS AND DISCUSSION

FACS analysis of EAE infiltrates. Parts of the spinal cord from EAE mice used for LCM were processed for FACS analysis of immune infiltrates. The leukocyte composition is in agreement with previous reports with 25% of lymphocytes (CD45.2+/CD11b-, data not showed), 39 % macrophages (CD11b+ Ly6G-), and 13% neutrophils (CD11b+Ly6G+). Lymphocytes were composed by 75 % T cells (CD3+) with a CD4/CD8 ratio of ~6.5, and by 4 % of B cell lineage (B220+) ; more than 80% of T cells were CD44+ CD62L- indicating an effector/memory phenotype (Supplementary Figure 1) .

RNA is well preserved after the different immunolabelling and LCM steps.

In order to ensure that the immunostaining or microdissection steps preserved sufficient RNA, we first checked the integrity of the RNA extracted from the whole spinal cord coronal sections at each critical point of the protocol. Automatic analysis of the 28S/18S ratio using Agilent microelectrophoresis indicates a good preservation of RNAs (ratios >1.6) with our LCM protocol (Supplementary Fig. 2A, lanes 1-5). The use of high (2M) NaCl concentration in all immunolabeling steps was crucial to prevent loss and degradation of the RNA (Figure 2A, lane 6) in accordance with Brown & Smith (2009). The RIN (RNA integrity Number) was superior to 6.7 for the samples (exemple of a microelectrophoresis profile in Figure 2B) indicating relative well preserved RNA, whereas it dropped to 4-4.6 when high NaCl was omitted in the incubation steps. RIN of the LCM samples used for TDLA were 7.4 ± 0.3 .

TLDA analysis

We here present a selected transcriptomic profile of 42 genes of control and EAE spinal cord white matter astrocytes. About 4000-6000 ($5 \times 10^6 \mu\text{m}^2$) LCM dissected astrocytes were needed for obtaining sufficient RNA (~5 ng), which is in the expected range of RNA recovery for LCM-dissected mouse cells (1-10 pg/cell; Okaty et al., 2011). Mouse protoplasmic grey matter and fibrous white matter astrocytes are 2-4 fold smaller than their human counterpart (Oberheim et al., 2009), accounting for the high number of required mouse LCM-astrocytes. Table 2 summarizes the expression of transcripts that were examined in this study. All transcripts presented here were at least detected in the mixed tissue control sample, which contains liver, spleen and brain cDNAs and was used as a positive control for the probes.

Glial markers.

Expression of the astrocytic marker GFAP α mRNA was detected in all LCM samples although at fair levels in comparison to transcripts. No differences between control and EAE

astrocytes was evidenced. A slight increase (almost 2-fold) in GFAP mRNA is found in the spinal cord tissue of various ascending EAE models; this increase can be partly explained by an increased number of astrocytes in the white matter at EAE onset and increased in GFAP expression in grey matter astrocytes, which express in basal conditions lower levels of GFAP than white matter astrocytes. Moreover, GFAP α (the main GFAP species of white matter astrocytes) mRNAs are localized all along process in contrast to most mRNA concentrated around the nucleus (Thomsen et al., 2013). Because LCM targeted proximal processes, it is possible that GFAP α mRNA is underrepresented in our samples, accounting for the absence of detectable GFAP α transcript increase during EAE. We were surprised to detect fair levels of MBP mRNA, which is specific for oligodendrocytes. In contrast, UGT8a transcript, which is highly enriched in oligodendroglial population (Cahoy et al., 2008) was detected at only very poor levels or not at all. MBP mRNA, the most abundant transcript in the CNS, was also recovered from mouse LCM-astrocytes in a previous study (Kigerl et al., 2007), suggesting that this abundant mRNA present in nearby oligodendrocyte processes is easily amplified even from minute amount of selected astrocytes *in situ*.

Markers of astrocyte reactivity

Lcn2 though not specific to the astrocytic population is now considered as a good marker of reactive astrocytes because its expression is highly increased in various experimental settings and CNS disease including EAE (Lee et al., 2009; Berard et al., 2012; Marques et al., 2012; Zamanian et al., 2012.). It was thus used as a prototypic marker of astrocyte reactivity. Indeed, we found this transcript highly upregulated in EAE samples validating the LCM approach. We also look at arginase 1, TSPO and its ligand DBI, serping1 and osteopontin (SPP1) transcripts because they have been highlighted as differentially induced in other models of neuroinflammation; particularly low induction of arg1 with high induction of TSPO and serping1 has been associated to a proinflammatory profile of LPS-reactive astrocytes; in contrast, high induction of arg1 transcripts with moderate increase in serping1 has been associated to a protective astrocytic profile in murine models of stroke, after transient middle cerebral artery occlusion (MCAO) (Zamanian et al., 2012) or photothrombotic ischemia (Quirie et al., 2013). Indeed, very high arg1 transcripts are found in spinal cord tissue during murine EAE (Carmody et al., 2002). However, we found that arg1 mRNA was poorly expressed in white matter astrocytes during EAE (Table 2) indicating that astrocytes are not a main source for arg1 production. Rather, during EAE, some activated microglia or

macrophages have been shown to express high levels of *arg1*, possibly having anti-inflammatory effects (Ahn et al., 2012).

TNF α a potent proinflammatory cytokines for astrocytes themselves. Although astrocytes exhibit fair levels of this transcript; it is not upregulated in EAE reactive astrocytes (Table 2). The increased TNF α expression in the CNS reported in previous EAE transcriptomic studies is rather ascribed to reactive microglia and infiltrated immune cells (Renno et al., 1995; Korn et al., 2005). Microglial TNF α is indeed highly detrimental to oligodendrocytes (Steelman et al., 2011). The interleukines IL-1 β , and IL-15 with its receptor IL15RA, as TNFSF9/4-1BBL and its receptor, were not detected here in LCM-astrocytes (except at poor level for one or two EAE samples), while they can be expressed by cultured astrocytes in inflammatory conditions. In EAE CNS tissue, activated microglia/macrophages and infiltrating lymphocytes are in fact the main producers of IL-1 β in EAE CNS tissue (Mandolesi et al., 2013) whereas IL-15 expression is mostly endothelial and its receptor IL15RA mostly neuronal (Stone et al., 2011; Wu et al., 2011).

On the other hand, whereas microglia was believed to be the main producer of TSPO, CNTF-stimulated striatal GFAP+ astrocytes in mice (Lavisse S et al, 2014) and reactive astrocytes in a MCAO murine model (Zamanian et al., 2012) clearly overexpress TSPO. The TSPO by interacting with mitochondrial membrane proteins is known to play a role in cholesterol mitochondrial import and thus in the first step of steroid production but also in various other functions including reactive oxygen species (ROS) generation. We found TSPO and Diazepam Binding Inhibitor (DBI) transcripts well expressed in control astrocytes and further upregulated in LCM- reactive astrocytes (Table 2), indicating that TSPO/DBI system is part of the astrocytic reactive signature during autoimmune neuroinflammation. In light with these observations, TSPO and DBI transcripts have been shown slightly increased in MS lesions, but the cellular origin not yet described (Luchetti et al., 2014).

The increased osteopontin (OSP1) expression in EAE astrocytes (Table 2) was somehow expected. We previously showed OPN immunoreactivity in infiltrating cells, mainly CD11c+ dendritic cells in late EAE (Giraud et al. 2010a), in agreement with previous reports showing high OPN expression by macrophages/dendritic cells, (Murugaiyan et al., 2008; Zhao et al., 2008) but also by activated CCR2+ CCR5+ T cells (Murugaiyan et al., 2008; Zhao et al., 2008) or B cells (Ma et al., 2014). However, a diffuse pattern of OPN immunoreactivity was also detected within the extracellular compartment of the white matter lesion. This could come from extracellular osteopontin secreted by immune cells and early reactive astrocytes.

Here, OPN transcript was clearly overexpressed in reactive astrocytes at EAE peak (5-6 dpe). In line with these observations, osteopontin was also found already overexpressed in the normal appearing white matter of MS brains, and predominantly confined to astrocytes (Sinclair et al., 2005). Finally, *serping1* was found to be also upregulated in EAE astrocytes. Serpin g1 (protease C1 inhibitor), a major regulator of the classical complement, is not a gene exclusively expressed by astrocytes, but has been shown to be drastically upregulated in FACS-sorted LPS-reactive astrocytes *in vivo* (Zamanian et al., 2012). Notably, *serpin g1* transcript is also upregulated in spinal cord lesions of progressive MS (Lieury et al., 2014). Taken together, the transcriptomic profile of EAE reactive astrocytes is consistent with a pro-inflammatory profile (overexpression of *TSPO*, *serping1*, and *SPP1*; low *arg1* mRNA expression).

Chemokines. It is well established that several chemokines are also expressed at low levels in resting astrocytes but are induced in a variety of inflammatory conditions. We looked at such prototypic chemokines whose expression has been shown to be induced in EAE spinal cord tissue (Carmody et al., 2002; Baranzini et al., 2005; Mueller et al., 2008; Brambilla et al., 2009; Berard et al., 2012; Inglis et al., 2012), and in MS brain (Baranzini et al., 2000, Simpson et al., 1998; Van der Voorn et al., 1999; Boven et al., 2000) and in primary astrocyte cultures treated with proinflammatory cytokines (Meeuwsen et al., 2003; Carpentier et al., 2005; John et al., 2005; Falsig et al., 2006; Halonen et al., 2006; Lisak et al., 2009). Among tested chemokine transcripts, *CCL2* (*SCYA2/MCP-1*), *CCL5* (*SCYA5/RANTES*), *CCL7* (*SCYA7*) were not detected in control astrocytes but induced in EAE samples (Table 2). Reactive astrocytes produce *CCL2* that is crucial for the recruitment of inflammatory monocytes and myelin-degrading macrophages (Shrestha et al., 2014; Kim et al., 2014; Moreno et al., 2014). Indeed, it has been shown to be overexpressed by reactive astrocytes in MS (Van der Voorn et al., 1999) and EAE (Giraud et al., 2010a; Spence et al., 2012). This upregulation seems restricted to the white matter astrocytes as it is not observed in grey matter during chronic EAE (table S3 in Giraud et al., 2010a), in the cuprizone demyelination model (Buschmann et al., 2012) as well as in MS (Prins et al., 2014). Similarly, *CCL7* is only detected in reactive astrocytes during EAE (Spence et al., 2012). In light with these data, it has been shown that *CCL2*, *CCL5*, *CXCL9* (*SCYB9*) and *CXCL10* (*SCYB10/IP-10*) expression is highly dependant of the inflammatory transcription factor *NFkB* and that transgenic mice with specific deletion of *NFkB* signaling in astrocytes exhibit decreased in those chemokines during EAE and reduced inflammatory response mounted in the CNS by infiltrates (Brambilla et al., 2009; 2014). Thus, the high increase in these chemokine

transcripts from our dissected astrocyte samples at the peak of EAE further validates our LCM strategy. In contrast, CXCL12 was poorly detected in LCM-astrocytes, which is in agreement with the preferential CXCL12 expression by endothelial cells in this model (McCandless et al., 2006). In MS brain, it has been indeed detected on blood vessels and astrocytes in chronic inactive as well as early active lesions (Krumbholz et al., 2006).

Among other chemokine transcripts upregulated during EAE, we also found CXCL16, whose expression and role in CNS injury is not well defined. CXCL16 transcript in contrast to previous chemokines was detected in control astrocytes and moderately increased in EAE samples (Table 2). CXCL16 is a transmembrane chemokine originally described as a scavenger receptor for oxidized LDL (Shimaoka et al., 2000), that can be cleaved to a soluble form by ADAM metalloproteinases, and released such as in astrocytoma cells upon inflammatory conditions (Ludwig et al., 2005). CXCL16 transcript was found upregulated 5-fold in spinal cord tissue in a slightly different murine EAE model (Baranzini et al., 2005). Cultured astrocytes were shown to express CXCL16 (Ludwig et al., 2005). Interestingly, recent data suggest that serum levels of CXCL16 reflect disease activity in MS (Holmøy et al., 2013). The CXCL16 receptor, CXCR6, is expressed by activated T cells and neutrophils (Wojkowska et al., 2014) and is important though not sufficient for CNS T cell infiltration or motility (Kim et al., 2009). However, recent data highlighted a neuroprotective role of CXCL16 *in vitro* (Rosito et al., 2012) and in a murine model of pMCAO (Rosito et al., 2014). The mechanism of action involves astrocytic release of CCL2 (Rosito et al 2012), which is rather deleterious for white matter during EAE as stressed above. Indeed, administration of CXCL16 antibody in adoptive transfer EAE reduced monocuclear cell trafficking and EAE symptoms (Fukumoto et al., 2004). CXCL16 expression has been recently described in MS astrocytes (Hendrickx et al., 2013) with a possible gender effect (Stojkovic et al., 2014). Whether the increase in astrocytic CXCL16 expression is deleterious or protective during MS needs further investigation.

Enzymes involved in steroid hormone inactivation.

We also look for the expression of two classes of genes involved in toxin and steroid inactivation by glucuronidation (UGT enzymes) or sulfoconjugation (SULT enzymes). None of the UGT tested were expressed in white matter astrocytes, whereas they were easily detected in the mixed tissue control that contains liver, an organ rich in UGT and SULT enzymes. Among all sulfotransferases, SULT1E1 and SULT1A1 are the only enzymes having estrogen sulfation activity. Sult1E1 mRNA is not expressed in brain (Raftogianis et al., 2000). We could not detect it from 100 ng spinal cord cDNA by real-time PCR (data not shown), nor

was it detected here in LCM-dissected astrocytes. We did not detect the expression of other sulfotransferases such as the androgen sulfotransferase *SULT2A1* in LCM-dissected astrocytes. In contrast, good signals were obtained for *SULT1A1* in control astrocytes and the expression was further slightly increased in EAE astrocytes (Table 2). Immunohistochemistry performed on spinal cord sections from paraformaldehyde-perfused control or EAE mice confirmed the specific expression of *SULT1A1* in GFAP⁺ astrocytes; *Sult1a1* antibody effectively labeled cytoplasmic astrocytic fibers in the white matter (Figure 3). Thus, among *SULT*, the relative high expression of *SULT1A1* in normal and reactive astrocytes is peculiar. Moreover, any of the *UGT* enzymes tested were found to be expressed in our astrocyte TLDA analysis (Table 2), suggesting that white matter astrocytes are not equipped to conjugate steroids by glucuronidation. Interestingly, *SULT1a1* mRNA has been shown recently to be induced in the spinal cord tissue of Lewis rat in a model of acute EAE (Inglis et al., 2012). When looking at microarrays that have been previously performed on MS tissue lesions, we found a report indicating that *SULT1A1* was about 2-fold increased in active lesions (3 patients) but not in inactive lesions from another patient (Supplementary 1 in Lock et al., 2002). Because all four patients were analyzed for statistics, it did not reach significance and was not highlighted. Nevertheless, this report indicates that *Sult1a1* transcript is clearly expressed in human CNS tissue and particularly in active lesions that contains reactive astrocytes.

CONCLUSION

We present here for the first time a selected transcriptomic (TLDA) profile from ex vivo LCM-captured spinal cord white matter astrocytes from adult mouse spinal cord in controls and during autoimmune neuroinflammation (EAE) in a model of multiple sclerosis. Among the gene transcripts analyzed, we highlighted here that *Sult1A1*, an enzyme having estrogen inactivating activity, is well expressed by spinal cord white matter astrocytes and further increased in EAE.

Whereas GFAP represents the best and widely used astrocytic marker, the volume covered by the GFAP staining is only 13% of the volume of cortical protoplasmic astrocytes (Martín-López et al., 2013), highlighting the need for additional astrocytic makers. Glutamate transporters *Glast-1* (*EAAT1/SLC1A3*) and *GLT-1* (*EAAT2, SLC1A2*) are often used to label and select resting astrocytes for *in vitro* studies or for transgenic mice (Slezak et al., 2007; Yang et al., 2011). However, their expression is down-regulated in several EAE

models (Ohgoh M et al., 2002; Korn et al., 2005). Moreover, these genes are also expressed in oligodendrocytes in human white matter (Werner et al., 2001; Pitt et al., 2003) making them poor markers for identifying reactive astrocytes during neuroinflammation. Aldh1L1 is very specific to astrocytic populations but is drastically down-regulated in the mature spinal cord compared to brain regions (Yang et al., 2011). In fact, in mouse brain gray matter, Sult1A1 is highly enriched in S100 promoter-driven GFP+ FACS sorted P16-17 astrocytes (Cahoy et al., 2008) as well as in adult Aldh1L1 expressing astrocytes (Doyle et al., 2008). Sult1a1 may thus be used as an additional astrocytic marker for immunocytochemistry or other tracing studies in adult mouse.

Recent studies have focused on radial glia and astrocytes as important steroid synthetic cells that provide active neurosteroids for local neuroendocrine functions and regulation of neurogenesis (Xing et al., 2014). On the other hand, studies on MS tissues have highlighted decreases in the expression of enzymes involved in neurosteroid biosynthesis in EAE and MS (Noorbakhsh et al., 2011; Inglis et al., 2012). In light of our observations, as well as the reported SULT1A1 transcript expression in MS active lesions (Lock et al., 2002) and the well-known specific estrogen sulfation activity of SULT1A, reactive astrocytes may have not only altered sex steroid synthesis but also higher estrogen conjugation activity, both leading to lower intracellular concentrations active estrogen. Strikingly, white matter reactive astrocytes express nuclear estrogen receptor alpha (ESR1) during EAE and in cell cultures (Giraud et al., 2010a) as well as in MS active lesions (Giraud et al., 2010b; Luchetti et al., 2014), so are they well equipped to respond to low doses of estrogen. However, only high nanomolar estrogens concentration are effective in reducing ongoing EAE and chemokine expression such as CCL2 (Giraud et al., 2010a). Interestingly 17 α -ethinylestradiol (EE2), an estrogen commonly used in oral contraceptives, has high affinity for SULT1A1 but is not sulfated and acts as a potent inhibitor of SULT1A1 (Rohn et al., 2012). This may account for the effectiveness of this compound when administered after disease onset to reduce murine EAE (Subramanian S et al. 2003) whereas only high nanomolar doses of the natural ligand 17 β -estradiol are effective (Giraud et al., 2010a). The relative high astrocytic expression levels of SULT1A1, which is further increased during EAE, may account for the relative resistance of this cell population to respond to exogenous low doses of 17 β -estradiol. This may hold true as well for MS astrocytes, an issue which now requires further investigation because a recent MS clinical trial using a postpartum 17 β -estradiol-based protocol has been recently disappointing (Durand-Dubief et al., 2014). Finally, in human, SULT1A1

polymorphisms (Raftogianis et al., 1997) and Copy Number Variations (Schulze et al., 2013) with differences in sulfation activity have been reported. Thus, large-scale genome-wide association studies may also consider examining SULT1A CNV or SNP when searching for genotype-phenotype associations, as highlighted by Bradley & Benner (2005). This could well apply to MS genomic studies.

ACKNOWLEDGEMENTS

This work was supported by Region Pays de la Loire, Rotary/Fondation de la Recherche sur le Cerveau and INSERM. We thank Dr I. Anegon for his support in the project.

Table 1. List of gene transcripts with their corresponding probes (ID assay)

Symbol	ID assay	Gene name
Arg1	Mm00475988_m1	arginase 1
Ccl2	Mm00441242_m1	chemokine (C-C motif) ligand 2
Ccl3	Mm00441259_g1	chemokine (C-C motif) ligand 3
Ccl5	Mm01302427_m1	chemokine (C-C motif) ligand 5
Ccl7	Mm00443113_m1	chemokine (C-C motif) ligand 7
Cxcl9	Mm00434946_m1	chemokine (C-X-C motif) ligand 9
Cxcl10	Mm00445235_m1	chemokine (C-X-C motif) ligand 10
Cxcl12	Mm00445553_m1	chemokine (C-X-C motif) ligand 12
Cxcl16	Mm00469712_m1	chemokine (C-X-C motif) ligand 16
Dbi	Mm00833261_g1	diazepam binding inhibitor
Gfap	Mm01253033_m1	glial fibrillary acidic protein
IL15	Mm00434210_m1	interleukin 15
IL15RA	Mm04336046_m1	interleukin 15 receptor, alpha chain
Il1b	Mm00434228_m1	interleukin 1 beta
Lcn2	Mm01324470_m1	lipocalin 2
Mbp	Mm01266402_m1	myelin basic protein
Serping1	Mm00437834_m1	serpin peptidase inhibitor, clade G, member 1
Spp1	Mm00436767_m1	secreted phosphoprotein 1 (osteopontin)
Sult1a1	Mm00467072_m1	sulfotransferase family 1A, phenol-preferring, member 1
Sult1c2	Mm00471849_m1	sulfotransferase family, cytosolic, 1C, member 2
Sult1d1	Mm00502035_m1	sulfotransferase family 1D, member 1
Sult1e1	Mm00499178_m1	sulfotransferase family 1E, member 1
Sult2a1	Mm04205659_mH	sulfotransferase family 2A, DHEA-preferring, member 2
Sult2b1	Mm00450550_m1	sulfotransferase family, cytosolic, 2B, member 1
Sult3a1	Mm00491057_m1	sulfotransferase family 3A, member 1
Tgfb1	Mm01178820_m1	transforming growth factor, beta 1
Tnf	Mm00443258_m1	tumor necrosis factor alpha
Tnfrsf9	Mm00441899_m1	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 9
Tnfsf9	Mm00437155_m1	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
Tspo	Mm00437828_m1	translocator protein
Ugt1a1	Mm02603337_m1	UDP glucuronosyltransferase 1 family, polypeptide A1
Ugt2a3	Mm00472170_m1	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide A3
Ugt2b34	Mm00655373_m1	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B34
ugt2b5	Mm01623253_s1	UDP glucuronosyltransferase 2 family, polypeptide B5
Ugt3a1	Mm01703504_mH	UDP glycosyltransferases 3 family, polypeptide A1
Ugt8a	Mm00495930_m1	UDP galactosyltransferase 8A
Housekeeping genes		
Hprt	Mm00446968_m1	hypoxanthine guanine phosphoribosyl transferase
Ppia	Mm02342430_g1	peptidylprolyl isomerase A
Tuba1a	Mm00846967_g1	tubulin, alpha 1A
GADPH	Mm99999915_g1	glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase

Table 2. Summary of TLDA analysis. Ct value for mixed tissue which contained liver, spleen and brain cDNA indicated that the probes were effective in detecting the transcript. dCt values for control and EAE correspond to Ct value of target gene – Ct geometric mean of the two housekeeping genes. For LCM-astrocyte samples, dCt values are expressed as mean \pm sem. Transcripts showing significant EAE-induced increased expression are in bold; *, $p < 0.05$; ns, $p > 0.05$; ¥, undetected in two of the three control samples (Ct value fixed to 38).

Gene symbol	Mix Tissue Ct value	LCM-astrocytes				
		dCt Con	dCt EAE	Fold increase (2^{-ddCt})		
Detected in all EAE samples at poor to good levels						
Arg1	25.1	14.3 \pm 1.0	13.2 \pm 1.5	2.2	ns	¥
Ccl2	23.3	12.0 \pm 0.5	3.5 \pm 0.6	349	*	¥
Ccl3	23.9	11.1 \pm 2.7	11.8 \pm 4.4	0.6	ns	
Ccl5	18.5	12.0 \pm 2.5	4.4 \pm 1.1	199	*	¥
Ccl7		12.5 \pm 2.1	4.6 \pm 0.4	231	*	¥
Cxcl9	21.3	13.0 \pm 1.7	4.9 \pm 0.9	270	*	¥
Cxcl10	21.7	13.8 \pm 1.1	6.1 \pm 0.6	214	*	¥
Cxcl16	21.4	9.8 \pm 1.9	5.0 \pm 0.5	28	*	¥
Dbi	12.8	0.7 \pm 0.2	-0.2 \pm 0.2	1.8	*	
Gfap	24.7	9.7 \pm 1.2	11.9 \pm 3.0	0.2	ns	
Lcn2	13.7	10.5 \pm 2.9	2.5 \pm 0.4	253	*	
Mbp	22.1	7.9 \pm 1.7	7.4 \pm 1.5	1.4	ns	
Serping1	16.5	11.0 \pm 2.5	5.4 \pm 0.3	48	*	
Spp1	23.2	13.1 \pm 1.1	7.3 \pm 1.0	54	*	
Sult1a1	18.1	10.5 \pm 0.5	7.5 \pm 0.7	7.7	*	
Tnf	33.3	10.2 \pm 0.8	13.9 \pm 1.5	0.1	ns	
Tspo	17.6	10.7 \pm 2.8	5.4 \pm 1.1	31	*	
Detected only in one or two EAE samples						
Il1b	26.2	Detected only in one EAE sample				
IL15	23.4	Detected only in two EAE samples				
IL15RA	22.9	Detected only in two EAE samples				
Tnfrsf9	28.8	Detected only in one EAE sample				
Tnfsf9	29.3	Detected only in one EAE sample				
Detected in all samples at very poor levels						
Cxcl12	24.6	13.9 \pm 0.8	14.6 \pm 1.7			
Tgfb1	33.6	13.9 \pm 1.1	18.2 \pm 0.5			
Ugt8a	30.1	12.7 \pm 1.7	17.7 \pm 0.4			
Undetected in all samples						
Sult1c2	25.0					
Sult1d1	22.8					
Sult1e1	25.1					
Sult2a1	18.3					
Sult2b1	23.2					
Sult3a1	19.7					
Ugt1a1	24.2					
Ugt2a3	21.6					
ugt2b5	20.2					
Ugt2b34	23.3					
Ugt3a1	23.3					

Supplementary Figure 1. Results of FACS analysis of EAE spinal cords used for LCM-astrocytes. After isolation of spinal cord infiltrate, the nature of the infiltrate was analysed. CD45.2+ CD11b labeling allow to select lymphocytes (about 25% CD45.2+CD11b- data not showed). The lymphocytes are composed of about 65% of CD3+CD4+ T cells, 10% of CD3+CD8+ and 4% of B cells. The analyse of CD4 and CD8 T cell population indicate that more than 80% of T cells were CD44+ CD62L- indicating an effector/memory phenotype.

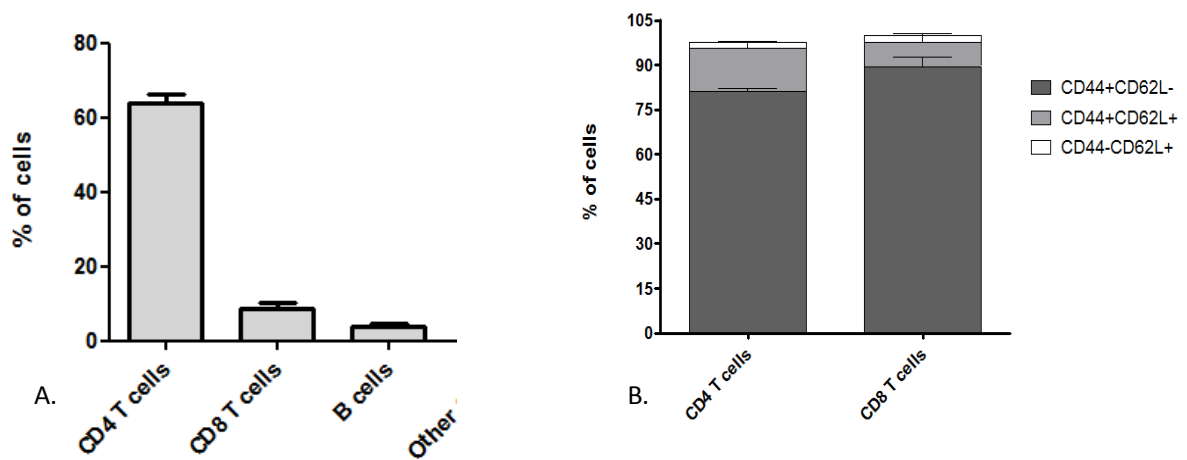


Figure 1. Immunolabeled LCM-astrocytes and housekeeping gene expression. (A-B) Example of immunostainings of T cells and astrocytes in white matter spinal cord. CD3 was used to label T cells and identify immune T cell infiltrated zones (A) and GFAP to label astrocytes (A', B, B'). B' show an exemple of an astrocyte drawing before cutting and catapulting. Scale bar: A-A', 70 μm ; B-B', 25 μm . (C) Analysis of the 4 housekeeping genes expressed in the LCM-dissected astrocyte samples (n=6, 5e6 μm^2 per mouse). Ct values indicated that TUB1A1 (TUB) and PPIA gave the most robust signals; the geometric mean of these two reference genes were thus used for dCt calculations. (1) One of six cDNA samples did not give a signal for GADPH.

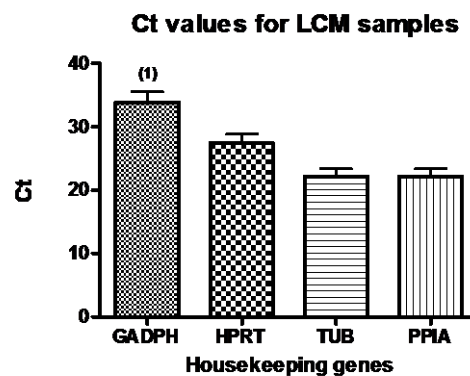
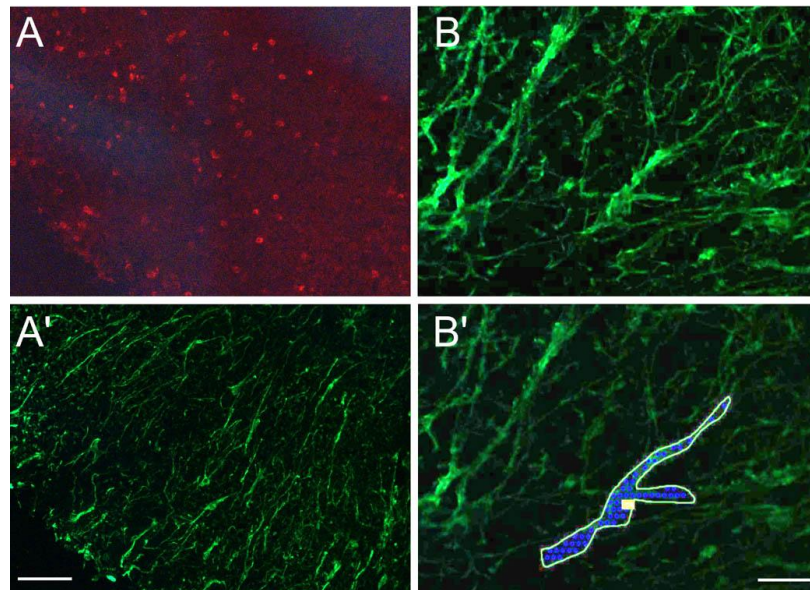


Figure 2. Assessment of RNA integrity during immunohistochemical steps and laser microdissection procedures. A. Microelectrophoresis of total RNA extracted from 8-12 coronal fresh-frozen spinal cord sections: (1) directly after quick defrosting (starting material); (2) after ethanol fixation; (3) at the end of the LCM immunohistochemistry steps in the presence of high NaCl concentration (high PBS); (4) with further 2h dry at room temperature corresponding to the maximum time needed for drawing, dissecting and capturing astrocytes on one slide and (5) in the remaining sections after the microdissection of astrocytes. (6) at the end of immunohistochemistry steps in the presence of isotonic NaCl concentration (normal PBS). B. Exemple of an electrophoregram with RIN value corresponding to (5).

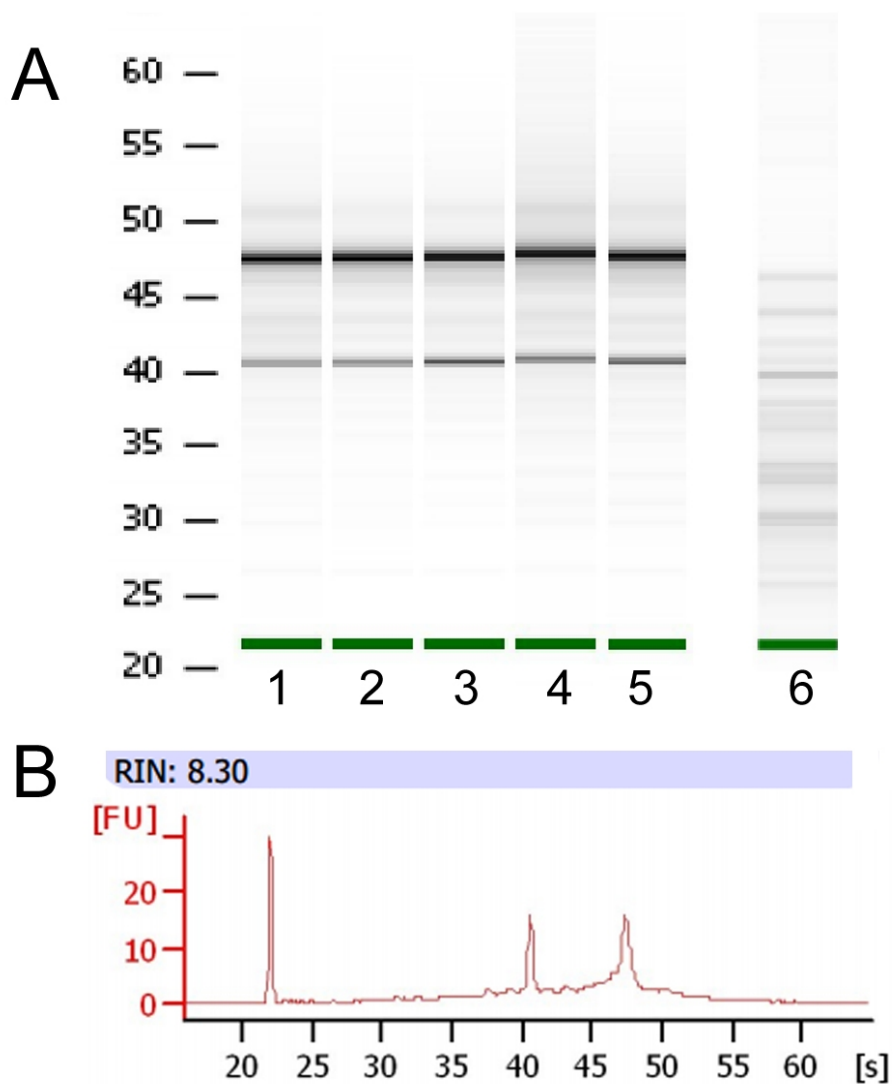
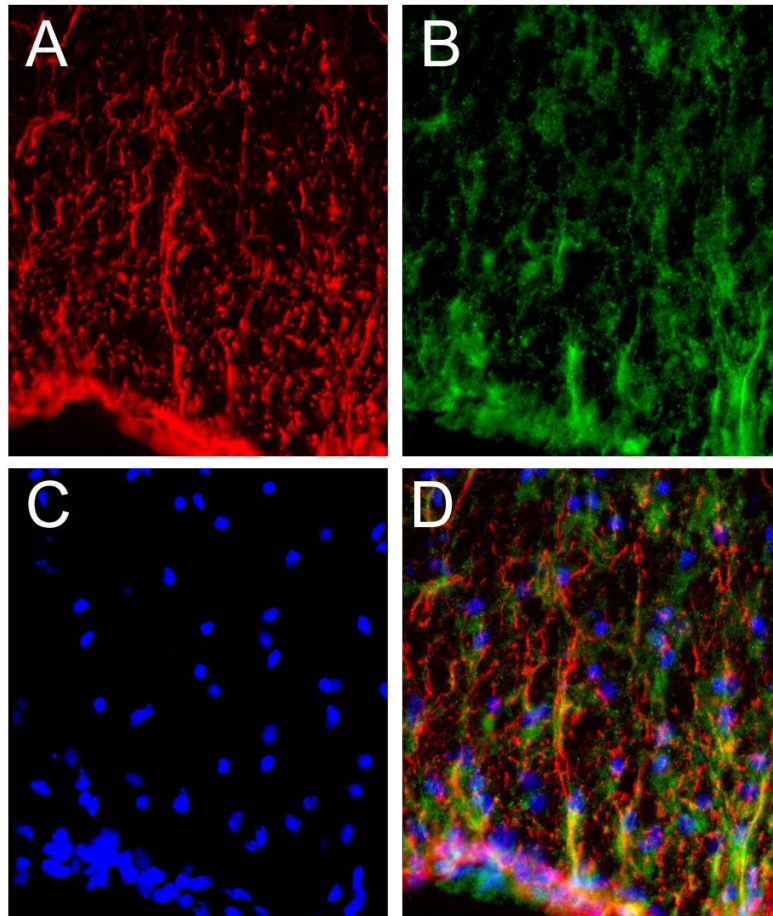


Figure 3. Representative immunostaining of astrocytes fibers and SULT1A in the white matter spinal cord. Sections of EAE and control spinal cord from paraformaldehyde perfused mice were processed for GFAP, SULT1A1 and DAPI stainings. White matter GFAP-labeled fibers (A, red) are associated with SULT1A1 staining (b, green). DAPI-stained nuclei in corresponding field (C, all merged in D).



BIBLIOGRAPHY

- Aloisi, F., Ria, F., Adorini, L., 2000. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunol. Today* 21, 141–147.
- Ahn, M., Yang, W., Kim, H., Jin, J.K., Moon, C., and Shin, T. (2012). Immunohistochemical study of arginase-1 in the spinal cords of Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Res* 1453, 77-86.
- Baranzini, S.E., Elfstrom, C., Chang, S.Y., Butunoi, C., Murray, R., Higuchi, R., and Oksenberg, J.R. (2000). Transcriptional analysis of multiple sclerosis brain lesions reveals a complex pattern of cytokine expression. *J Immunol* 165, 6576-6582.
- Baranzini, S.E., Bernard, C.C.A., Oksenberg, J.R., 2005. Modular transcriptional activity characterizes the initiation and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol.* 174, 7412–7422.
- Balashov, K.E., Rottman, J.B., Weiner H.L., Hancock, W.W., 1999 CCR5(+) and CXCR3(+) T cells are increased in multiple sclerosis and their ligands MIP-1alpha and IP-10 are expressed in demyelinating brain lesions. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 96, 6873-8.
- Baumann, N., Pham-Dinh, D., 2001. Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiol. Rev.* 81, 871–927.
- Berard, J.L., Zarruk, J.G., Arbour, N., Prat, A., Yong, V.W., Jacques, F.H., Akira, S., and David, S. (2012). Lipocalin 2 is a novel immune mediator of experimental autoimmune encephalomyelitis pathogenesis and is modulated in multiple sclerosis. *Glia* 60, 1145-1159.
- Boven, L.A., Montagne, L., Nottet, H.S., and De Groot, C.J. (2000). Macrophage inflammatory protein-1alpha (MIP-1alpha), MIP-1beta, and RANTES mRNA semiquantification and protein expression in active demyelinating multiple sclerosis (MS) lesions. *Clin Exp Immunol* 122, 257-263.
- Bradley, M.E., Benner, S.A., 2005. Phylogenomic approaches to common problems encountered in the analysis of low copy repeats: the sulfotransferase 1A gene family example. *BMC Evol. Biol.* 5, 22.
- Brambilla, R., Persaud, T., Hu, X., Karmally, S., Shestopalov, V.I., Dvorianchikova, G., Ivanov, D., Nathanson, L., Barnum, S.R., and Bethea, J.R. (2009). Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B improves functional outcome in experimental autoimmune encephalomyelitis by suppressing chronic central nervous system inflammation. *J Immunol* 182, 2628-2640.
- Brambilla, R., Morton, P.D., Ashbaugh, J.J., Karmally, S., Lambertsen, K.L., Bethea, J.R., 2014. Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia* 62, 452–467.
- Brown, A.L., Smith, D.W., 2009. Improved RNA preservation for immunolabeling and laser microdissection. *RNA N. Y. N* 15, 2364–2374.

Carpentier, P.A., Begolka, W.S., Olson, J.K., Elhofy, A., Karpus, W.J., and Miller, S.D. (2005). Differential activation of astrocytes by innate and adaptive immune stimuli. *Glia* 49, 360-374.

John, G.R., Lee, S.C., Song, X., Rivieccio, M., and Brosnan, C.F. (2005). IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia* 49, 161-176.

Falsig, J., Porzgen, P., Lund, S., Schratzenholz, A., and Leist, M. (2006). The inflammatory transcriptome of reactive murine astrocytes and implications for their innate immune function. *J Neurochem* 96, 893-907.

Halonen, S.K., Woods, T., McInnerney, K., and Weiss, L.M. (2006). Microarray analysis of IFN-gamma response genes in astrocytes. *J Neuroimmunol* 175, 19-30.

Buschmann, J.P., Berger, K., Awad, H., Clarner, T., Beyer, C., Kipp, M., 2012. Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. *J. Mol. Neurosci.* MN 48, 66–76.

Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., Thompson, W.J., Barres, B.A., 2008. A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci.* 28, 264–278.

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.

Demarest, T.G., Murugesan, N., Shrestha, B., and Pachter, J.S. (2012). Rapid expression profiling of brain microvascular endothelial cells by immuno-laser capture microdissection coupled to TaqMan((R)) low density array. *J Neurosci Methods* 206, 200-204.

Doyle, J.P., Dougherty, J.D., Heiman, M., Schmidt, E.F., Stevens, T.R., Ma, G., Bupp, S., Shrestha, P., Shah, R.D., Doughty, M.L., et al. (2008). Application of a translational profiling approach for the comparative analysis of CNS cell types. *Cell* 135, 749-762.

Durand-Dubief, F., El-Etr, M., Ionescu, I., Bracoud, L., Cotton, F., Merle, H., Cornu, C., Frangoulis, B., Remontet, L., Bossard, N., Durelli, L., Baulieu, E-E, Confavreux, C., Vukusic, S., for the Investigators of the POPARTMUS Study. The POPARTMUS French-Italian multicentric trial of postpartum progestin and estradiol in multiple sclerosis: MRI findings. *ECTRIMS*, Sept 2014.

Emmert-Buck, M.R., Bonner, R.F., Smith, P.D., Chuaqui, R.F., Zhuang, Z., Goldstein, S.R., Weiss, R.A., Liotta, L.A., 1996. Laser capture microdissection. *Science* 274, 998–1001.

Farina, C., Aloisi, F., Meinl, E., 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* 28, 138–145. doi:10.1016/j.it.2007.01.005

Fukumoto, N., Shimaoka, T., Fujimura, H., Sakoda, S., Tanaka, M., Kita, T., and Yonehara, S. (2004). Critical roles of CXC chemokine ligand 16/scavenger receptor that binds phosphatidylserine and oxidized lipoprotein in the pathogenesis of both acute and adoptive transfer experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 173, 1620-1627.

Gourdain, P., Ballerini, C., Nicot, A.B., and Carnaud, C. (2012). Exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis in prion protein (PrP^c)-null mice: evidence for a critical role of the central nervous system. *J Neuroinflammation* 9, 25.

Giraud, S.N., Caron, C.M., Pham-Dinh, D., Kitabgi, P., Nicot, A.B., 2010a. Estradiol inhibits ongoing autoimmune neuroinflammation and NF κ B-dependent CCL2 expression in reactive astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107, 8416–8421. doi:10.1073/pnas.0910627107

Giraud, S.N., Seilhean, D., Pham-Dinh, D., Nicot A.B., 2010b. White matter reactive astrocytes express nuclear estrogen receptor alpha in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 248:27.

Hendrickx, D.A., Koning, N., Schuurman, K.G., van Strien, M.E., van Eden, C.G., Hamann, J., and Huitinga, I. (2013). Selective upregulation of scavenger receptors in and around demyelinating areas in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 72, 106-118.

Holmøy, T., Løken-Amsrud, K.I., Bakke, S.J., Beiske, A.G., Bjerve, K.S., Hovdal, H., Lilleås, F., Midgard, R., Pedersen, T., Saltytè Benth, J., Torkildsen, O., Wergeland, S., Myhr, K.-M., Michelsen, A.E., Aukrust, P., Ueland, T., 2013. Inflammation markers in multiple sclerosis: CXCL16 reflects and may also predict disease activity. *PloS One* 8, e75021.

Krumbholz M, Theil D, Cepok S, Hemmer B, Kivisäkk P, Ransohoff RM, Hofbauer M, Farina C, Derfuss T, Hartle C, Newcombe J, Hohlfeld R, Meinl E, 2006. Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* 129, 200-11.

Inglis, H.R., Greer, J.M., McCombe, P.A., 2012. Gene expression in the spinal cord in female Lewis rats with experimental autoimmune encephalomyelitis induced with myelin basic protein. *PloS One* 7, e48555.

Ishibashi, T., Dakin, K.A., Stevens, B., Lee, P.R., Kozlov, S.V., Stewart, C.L., Fields, R.D., 2006. Astrocytes promote myelination in response to electrical impulses. *Neuron* 49, 823–832.

Kigerl, K.A., Lai, W., Rivest, S., Hart, R.P., Satoskar, A.R., and Popovich, P.G. (2007). Toll-like receptor (TLR)-2 and TLR-4 regulate inflammation, gliosis, and myelin sparing after spinal cord injury. *J Neurochem* 102, 37-50.

Kim, J.V., Jiang, N., Tadokoro, C.E., Liu, L., Ransohoff, R.M., Lafaille, J.J., and Dustin, M.L. (2009). Two-photon laser scanning microscopy imaging of intact spinal cord and cerebral cortex reveals requirement for CXCR6 and neuroinflammation in immune cell infiltration of cortical injury sites. *J Immunol Methods* 352, 89-100.

Kim, R.Y., Hoffman, A.S., Itoh, N., Ao, Y., Spence, R., Sofroniew, M.V., Voskuhl, R.R., 2014. Astrocyte CCL2 sustains immune cell infiltration in chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 274, 53–61.

Korn, T., Magnus, T., Jung, S., 2005. Autoantigen specific T cells inhibit glutamate uptake in astrocytes by decreasing expression of astrocytic glutamate transporter GLAST: a mechanism mediated by tumor necrosis factor-alpha. *FASEB J.* 19, 1878–1880.

- Lee, S., Park, J.-Y., Lee, W.-H., Kim, H., Park, H.-C., Mori, K., Suk, K., 2009. Lipocalin-2 Is an Autocrine Mediator of Reactive Astrocytosis. *J. Neurosci.* 29, 234–249.
- Lieury, A., Chanal, M., Androdias, G., Reynolds, R., Cavagna, S., Giraudon, P., Confavreux, C., Nataf, S., 2014. Tissue remodeling in periplaque regions of multiple sclerosis spinal cord lesions. *Glia* 62, 1645–1658.
- Lipton, H.L., Kallio, P., Jelachich, M.L., 2005. Simplified quantitative analysis of spinal cord cells from Theiler's virus-infected mice without the requirement for myelin debris removal. *J. Immunol. Methods* 299, 107–115.
- Lisak, R.P., Benjamins, J.A., Bealmear, B., Nedelkoska, L., Studzinski, D., Retland, E., Yao, B., and Land, S. (2009). Differential effects of Th1, monocyte/macrophage and Th2 cytokine mixtures on early gene expression for molecules associated with metabolism, signaling and regulation in central nervous system mixed glial cell cultures. *J Neuroinflammation* 6, 4.
- Livak, K.J., and Schmittgen, T.D. (2001). Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta C(T)}$ Method. *Methods* 25, 402-408.
- Lock, C., Hermans, G., Pedotti, R., Brendolan, A., Schadt, E., Garren, H., Langer-Gould, A., Strober, S., Cannella, B., Allard, J., Klonowski, P., Austin, A., Lad, N., Kaminski, N., Galli, S.J., Oksenberg, J.R., Raine, C.S., Heller, R., Steinman, L., 2002a. Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.* 8, 500–508. doi:10.1038/nm0502-500
- Luchetti, S., van Eden, C.G., Schuurman, K., van Strien, M.E., Swaab, D.F., Huitinga, I., 2014. Gender differences in multiple sclerosis: induction of estrogen signaling in male and progesterone signaling in female lesions. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 73, 123osis: induction of estrogen signaling
- Ludwig, A., Schulte, A., Schnack, C., Hundhausen, C., Reiss, K., Brodway, N., Held-Feindt, J., Mentlein, R., 2005. Enhanced expression and shedding of the transmembrane chemokine CXCL16 by reactive astrocytes and glioma cells. *J. Neurochem.* 93, 1293–1303. doi:10.1111/j.1471-4159.2005.03123.x
- Ma, N., He, Y., Xiao, H., Han, G., Chen, G., Wang, Y., Wang, K., Hou, C., Yang, X., Marrero, B., Wang, Y., Shen, B., Li, Y., Wang, R., 2014. BAFF maintains T-cell survival by inducing OPN expression in B cells. *Mol. Immunol.* 57, 129–137. doi:10.1016/j.molimm.2013.08.014
- Mandolesi, G., Musella, A., Gentile, A., Grasselli, G., Haji, N., Sepman, H., Fresegna, D., Bullitta, S., De Vito, F., Musumeci, G., et al. (2013). Interleukin-1beta alters glutamate transmission at purkinje cell synapses in a mouse model of multiple sclerosis. *J Neurosci* 33, 12105-12121.
- Marques, F., Mesquita, S.D., Sousa, J.C., Coppola, G., Gao, F., Geschwind, D.H., Columba-Cabezas, S., Aloisi, F., Degn, M., Cerqueira, J.J., et al. (2012). Lipocalin 2 is present in the EAE brain and is modulated by natalizumab. *Front Cell Neurosci* 6, 33.
- Martin-Lopez, E., Alonso, F.R., Nieto-Diaz, M., and Nieto-Sampedro, M. Chitosan, gelatin and poly(L-lysine) polyelectrolyte-based scaffolds and films for neural tissue engineering. *J Biomater Sci Polym Ed* 23, 207-232.

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

Meeuwsen, S., Persoon-Deen, C., Bsibsi, M., Ravid, R., and van Noort, J.M. (2003). Cytokine, chemokine and growth factor gene profiling of cultured human astrocytes after exposure to proinflammatory stimuli. *Glia* 43, 243-253.

Murugaiyan, G., Mittal, A., Weiner, H.L., 2008. Increased osteopontin expression in dendritic cells amplifies IL-17 production by CD4+ T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis and in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md* 1950 181, 7480–7488.

Nicot, A., Ratnakar, P.V., Ron, Y., Chen, C.C., and Elkabes, S. (2003). Regulation of gene expression in experimental autoimmune encephalomyelitis indicates early neuronal dysfunction. *Brain* 126, 398-412.

Noorbakhsh, F., Ellestad, K.K., Maingat, F., Warren, K.G., Han, M.H., Steinman, L., Baker, G.B., Power, C., 2011. Impaired neurosteroid synthesis in multiple sclerosis. *Brain* 134, 2703–2721. doi:10.1093/brain/awr200

Oberheim, N.A., Takano, T., Han, X., He, W., Lin, J.H., Wang, F., Xu, Q., Wyatt, J.D., Pilcher, W., Ojemann, J.G., et al. (2009). Uniquely hominid features of adult human astrocytes. *J Neurosci* 29, 3276-3287.

Ohgoh, M., Hanada, T., Smith, T., Hashimoto, T., Ueno, M., Yamanishi, Y., Watanabe, M., Nishizawa, Y., 2002. Altered expression of glutamate transporters in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroimmunol.* 125, 170–178.

Okaty, B.W., Sugino, K., Nelson, S.B., 2011. A quantitative comparison of cell-type-specific microarray gene expression profiling methods in the mouse brain. *PloS One* 6, e16493.

Pitt, D., Nagelmeier, I.E., Wilson, H.C., Raine, C.S., 2003. Glutamate uptake by oligodendrocytes: Implications for excitotoxicity in multiple sclerosis. *Neurology* 61, 1113–1120.

Prins, M., Dutta, R., Baselmans, B., Brevé, J.J.P., Bol, J.G.J.M., Deckard, S.A., van der Valk, P., Amor, S., Trapp, B.D., de Vries, H.E., Drukarch, B., van Dam, A.-M., 2014. Discrepancy in CCL2 and CCR2 expression in white versus grey matter hippocampal lesions of Multiple Sclerosis patients. *Acta Neuropathol. Commun.* 2, 98.

Quirie, A., Demougeot, C., Bertrand, N., Mossiat, C., Garnier, P., Marie, C., and Prigent-Tessier, A. (2013).

Effect of stroke on arginase expression and localization in the rat brain. *Eur J Neurosci* 37, 1193-1202.

Raftogianis, R., Creveling, C., Weinshilboum, R., Weisz, J., 2000. Estrogen metabolism by conjugation. *J. Natl. Cancer Inst. Monogr.* 113–124.

Raftogianis RB, Wood TC, Otterness DM, Van Loon JA, Weinshilboum RM (1997) Phenol sulfotransferase pharmacogenetics in humans: association of common SULT1A1 alleles with TS PST phenotype. *Biochem Biophys Res Commun* 239:298–304.

- Renno, T., Krakowski, M., Piccirillo, C., Lin, J.Y., and Owens, T. (1995). TNF- α expression by resident microglia and infiltrating leukocytes in the central nervous system of mice with experimental allergic encephalomyelitis. Regulation by Th1 cytokines. *J Immunol* 154, 944-953.
- Ridet, J.L., Malhotra, S.K., Privat, A., Gage, F.H., 1997. Reactive astrocytes: cellular and molecular cues to biological function. *Trends Neurosci.* 20, 570–577.
- Rohn, K.J., Cook, I.T., Leyh, T.S., Kadlubar, S.A., Falany, C.N., 2012. Potent inhibition of human sulfotransferase 1A1 by 17 α -ethinylestradiol: role of 3'-phosphoadenosine 5'-phosphosulfate binding and structural rearrangements in regulating inhibition and activity. *Drug Metab. Dispos. Biol. Fate Chem.* 40, 1588–1595. doi:10.1124/dmd.112.045583
- Rosito, M., Deflorio, C., Limatola, C., Trettel, F., 2012. CXCL16 orchestrates adenosine A3 receptor and MCP-1/CCL2 activity to protect neurons from excitotoxic cell death in the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 3154–3163.
- Rosito, M., Lauro, C., Chece, G., Porzia, A., Monaco, L., Mainiero, F., Catalano, M., Limatola, C., Trettel, F., 2014. Transmembrane chemokines CX3CL1 and CXCL16 drive interplay between neurons, microglia and astrocytes to counteract pMCAO and excitotoxic neuronal death. *Front. Cell. Neurosci.* 8, 193.
- Schulze, J., Johansson, M., Thörngren, J.-O., Garle, M., Rane, A., Ekström, L., 2013. SULT2A1 Gene Copy Number Variation is Associated with Urinary Excretion Rate of Steroid Sulfates. *Front. Endocrinol.* 4, 88. doi:10.3389/fendo.2013.00088
- Shimaoka, T., Kume, N., Minami, M., Hayashida, K., Kataoka, H., Kita, T., Yonehara, S., 2000. Molecular cloning of a novel scavenger receptor for oxidized low density lipoprotein, SR-PSOX, on macrophages. *J. Biol. Chem.* 275, 40663–40666. doi:10.1074/jbc.C000761200
- Shrestha, B., Ge, S., Pachter, J.S., 2014. Resolution of central nervous system astrocytic and endothelial sources of CCL2 gene expression during evolving neuroinflammation. *Fluids Barriers CNS* 11, 6.
- Shimaoka, T., Nakayama, T., Fukumoto, N., Kume, N., Takahashi, S., Yamaguchi, J., Minami, M., Hayashida, K., Kita, T., Ohsumi, J., et al. (2004). Cell surface-anchored SR-PSOX/CXC chemokine ligand 16 mediates firm adhesion of CXC chemokine receptor 6-expressing cells. *J Leukoc Biol* 75, 267-274.
- Simpson, J.E., Newcombe, J., Cuzner, M.L., and Woodroffe, 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.
- Sinclair, C., Mirakhor, M., Kirk, J., Farrell, M., McQuaid, S., 2005. Up-regulation of osteopontin and alphaBeta-crystallin in the normal-appearing white matter of multiple sclerosis: an immunohistochemical study utilizing tissue microarrays. *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 31, 292–303.

Slezak, M., Göritz, C., Niemiec, A., Frisé, J., Chambon, P., Metzger, D., Pfrieger, F.W., 2007. Transgenic mice for conditional gene manipulation in astroglial cells. *Glia* 55, 1565–1576.

Spence, R.D., Voskuhl, R.R., 2012. Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration. *Front. Neuroendocrinol.* 33, 105–115.

Steelman, A.J., and Li, J. (2011). Poly(I:C) promotes TNF α /TNFR1-dependent oligodendrocyte death in mixed glial cultures. *J Neuroinflammation* 8, 89.

Stojkovic, L., Stankovic, A., Djuric, T., Dincic, E., Alavantic, D., and Zivkovic, M. (2014). The gender-specific association of CXCL16 A181V gene polymorphism with susceptibility to multiple sclerosis, and its effects on PBMC mRNA and plasma soluble CXCL16 levels: preliminary findings. *J Neurol* 261, 1544-1551.

Stone, K.P., Kastin, A.J., and Pan, W. (2011). NF κ B is an unexpected major mediator of interleukin-15 signaling in cerebral endothelia. *Cell Physiol Biochem* 28, 115-124.

Subramanian, S., Matejuk, A., Zamora, A., Vandenbark, A.A., Offner, H., 2003. Oral feeding with ethinyl estradiol suppresses and treats experimental autoimmune encephalomyelitis in SJL mice and inhibits the recruitment of inflammatory cells into the central nervous system. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 170, 1548–1555.

Thomsen, R., Daugaard, T.F., Holm, I.E., and Nielsen, A.L. (2013). Alternative mRNA splicing from the glial fibrillary acidic protein (GFAP) gene generates isoforms with distinct subcellular mRNA localization patterns in astrocytes. *PLoS One* 8, e72110.

Vandesompele, J., De Preter, K., Pattyn, F., Poppe, B., Van Roy, N., De Paepe, A., and Speleman, F. (2002). Accurate normalization of real-time quantitative RT-PCR data by geometric averaging of multiple internal control genes. *Genome Biol* 3, RESEARCH0034.

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

Vegeto, E., Belcredito, S., Ghisletti, S., Meda, C., Etteri, S., Maggi, A., 2006. The endogenous estrogen status regulates microglia reactivity in animal models of neuroinflammation. *Endocrinology* 147, 2263–2272.

Werner, P., Pitt, D., Raine, C.S., 2001. Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Ann. Neurol.* 50, 169–180.

Wojkowska, D.W., Szpakowski, P., Ksiazek-Winiarek, D., Leszczynski, M., and Glabinski, A. (2014). Interactions between neutrophils, Th17 cells, and chemokines during the initiation of experimental model of multiple sclerosis. *Mediators Inflamm* 2014, 590409.

Wu, X., Pan, W., He, Y., Hsuchou, H., and Kastin, A.J. (2011). Cerebral interleukin-15 shows upregulation and beneficial effects in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 223, 65-72.

Xing, L., Goswami, M., Trudeau, V.L., 2014. Radial glial cell: Critical functions and new perspective as a steroid synthetic cell. *Gen. Comp. Endocrinol.* 203C, 181–185.

Yang, Y., Vidensky, S., Jin, L., Jie, C., Lorenzini, I., Frankl, M., and Rothstein, J.D. (2011). Molecular comparison of GLT1+ and ALDH1L1+ astrocytes in vivo in astroglial reporter mice. *Glia* 59, 200-207.

Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., Barres, B.A., 2012. Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 32, 6391–6410.

Zamvil, S.S., Steinman, L., 2003. Diverse targets for intervention during inflammatory and neurodegenerative phases of multiple sclerosis. *Neuron* 38, 685–688.

CONCLUSION

La microdissection laser nous a permis d'isoler les astrocytes de la substance blanche et d'étudier l'expression de différents gènes par PCR quantitative grâce à l'utilisation des cartes microfluidiques préchargées en sondes TaqMan TLDA. En effet, cette méthode a été validée grâce à la surexpression de certains gènes impliqués dans la réponse pro-inflammatoire déjà décrits dans la littérature, notamment dans les premières études transcriptomiques à l'échelon tissulaire dans les modèles EAE (Baranzini et al., 2005). Ainsi, nous avons retrouvé l'augmentation astrocytaire de l'expression des chimiokines comme CCL2 (Giraud et al., 2010) ou CCL7 rapportée par immunohistochimie dans les astrocytes réactifs au cours de l'EAE (Spence and Voskuhl, 2012). De plus, l'analyse a permis de mettre en évidence la surexpression de transcripts de l'astrocyte réactif comme TSPO et Serping1 décrite dans un autre modèle de neuroinflammation délétère (induite par le LPS, Zamanian et al., 2012). L'analyse de l'expression d'enzymes impliquées dans le métabolisme des stéroïdes et notamment des œstrogènes a permis de mettre en évidence l'expression relativement forte dans les astrocytes des souris contrôles de Sult1a1. Dans l'astrocyte réactif, cette enzyme est encore plus surexprimée au cours de l'EAE. Non seulement cette enzyme apparait comme un bon marqueur cytoplasmique des astrocytes, mais elle pourrait expliquer la relative résistance de cette population à répondre à de faibles concentration d'œstrogènes.

Il serait maintenant intéressant d'étendre la liste de gènes à étudier dans ce modèle EAE et de le comparer avec le profil obtenu à partir des lésions des patients atteints de la SEP. La réalisation d'une étude de transcriptomique sur tissus de patients atteints de la SEP est plus difficile du fait de la morphologie tissulaire et de la qualité de l'ARN moins bonne des tissus post-mortem. L'analyse non exhaustive de la présence ou non de certains récepteurs membranaires à la surface des astrocytes réactifs serait une nouvelle voie de recherche intéressante d'un point de vue thérapeutique. Par exemple, la surexpression de certains récepteurs par les astrocytes pourrait représenter une cible pharmaceutique potentielle, d'autant plus si le récepteur était spécifique de l'astrocyte. On peut rappeler ici l'intérêt qu'a apporté la découverte de la présence du S1P1-R et de sa fonction dans le contrôle local de la neuroinflammation décrit récemment (Choi et al., 2011). Le blocage de ce récepteur S1P1 par voie médicamenteuse grâce au fingolimod permet de réduire l'astrogliose dans le modèle EAE.

Toutefois, l'intensité de l'inflammation peut, elle-même, influencer sur l'expression génique variée des astrocytes. Dans un modèle animal de démyélinisation par la cuprizone la

période de démyélinisation est associée à une forte expression des chimiokines proinflammatoires (Buschmann et al., 2012). Les astrocytes vont permettre de remyéliniser localement les lésions grâce à la sécrétion de BDNF (Brain-Derived Neurotrophic Factor) favorisant la différenciation des oligodendrocytes. Toutefois, si l'inflammation au sein du SNC s'accroît, les astrocytes ne vont plus sécréter le facteur de croissance BDNF bénéfique aux oligodendrocytes (Fulmer et al., 2014).

De plus, il a été montré qu'il n'existait pas un type d'astrocyte réactif mais différents types de réactivité en fonction de leur morphologie et de leur localisation au sein du SNC (protoplastiques vs. fibreux ou radiaires) mais aussi une même population, en fonction du modèle de neuroinflammation (Zamanian et al., 2012).

L'étude de l'implication des LT CD8 dans la pathogénie de la SEP reste un axe de recherche primordial au vu de leurs présences importantes dans les lésions SEP. Le phénotype de ces LT CD8 infiltrants a récemment été décrit, au sein du laboratoire, comme étant majoritairement des LT effecteurs mémoires granzyme B+ de type pro-inflammatoires (Salou et al., en soumission). Comme nous l'avons déjà évoqué, à ce jour, il n'existe pas de modèle EAE CD8 idéal pour une étude transcriptomique à partir d'astrocytes microdisséqués dans des lésions riches en LT CD8. Il existe soit des modèles EAE où les LT CD8 sont abondants mais n'ont pas d'activité encéphalitogène (Leuenberger et al., 2013), soit des modèles où les LT CD8 sont activés (T effecteurs mémoires INF γ + ou Granzyme B+) mais ne sont retrouvés que de façon éparse dans le parenchyme nerveux (Ifergan et al., 2011; Saxena et al., 2008), voire surtout localisés dans les méninges (Ifergan et al., 2011). Bien que le modèle MOG 37-46 favorise un enrichissement des LT CD8, il reste un modèle mixte CD4-CD8. Une analyse différentielle du profil astrocytaire obtenu à partir d'un modèle transgénique TCR MOG sur les LT CD4 (modèle EAE 2D2) et de notre modèle EAE induit MOG 37-46 permettrait de pointer les gènes différentiellement induits et résultants de la présence des LT CD4 vs CD8.

Ces données illustrent l'importance de l'environnement local et de l'expression des molécules pro- versus anti-inflammatoires par les cellules du parenchyme nerveux dans le processus de réparation. Ce phénomène est également important et reconnu en clinique dans le domaine de la transplantation. Ainsi, l'importance de l'état du greffon est directement corrélée à la réussite de la greffe. Lorsque le greffon subit des stress extérieurs dus à une mauvaise oxygénation ou à une mauvaise température de conservation, il peut y avoir des modifications transcriptionnelles et métaboliques dans le tissu qui rendront l'organe plus

sensible aux attaques du système immunitaire de l'hôte, après la greffe. Plusieurs travaux décrivent l'impact de ces modifications sur la réponse immunitaire avec des recommandations précises quant aux modes de conservation et reperfusion optimale avant transplantation (Francischetti et al., 2010; Kokura et al., 2000).

Connaitre la réponse de l'astrocyte et de son rôle dans différents contextes inflammatoire est donc important pour moduler pharmacologiquement cette réponse, à des fins thérapeutiques, et ce dans les maladies du SNC. Bien qu'il soit toujours intéressant d'agir sur le système immunitaire dans le cadre de la SEP, l'étude de co-thérapie agissant sur l'environnement local du parenchyme nerveux et notamment sur les astrocytes mérite une attention particulière.

BIBLIOGRAPHIE

- Abbott, N.J., Rönnbäck, L., and Hansson, E. (2006). Astrocyte–endothelial interactions at the blood–brain barrier. *Nat. Rev. Neurosci.* 7, 41–53.
- Alliot, F., Godin, I., and Pessac, B. (1999). Microglia derive from progenitors, originating from the yolk sac, and which proliferate in the brain. *Brain Res. Dev. Brain Res.* 117, 145–152.
- Aloisi, F. (2001). Immune function of microglia. *Glia* 36, 165–179.
- Aloisi, F., Borsellino, G., Samoggia, P., Testa, U., Chelucci, C., Russo, G., Peschle, C., and Levi, G. (1992). Astrocyte cultures from human embryonic brain: characterization and modulation of surface molecules by inflammatory cytokines. *J. Neurosci. Res.* 32, 494–506.
- Aloisi, F., Ria, F., Columba-Cabezas, S., Hess, H., Penna, G., and Adorini, L. (1999). Relative efficiency of microglia, astrocytes, dendritic cells and B cells in naive CD4+ T cell priming and Th1/Th2 cell restimulation. *Eur. J. Immunol.* 29, 2705–2714.
- Alvarez, J.I., Dodelet-Devillers, A., Kebir, H., Ifergan, I., Fabre, P.J., Terouz, S., Sabbagh, M., Wosik, K., Bourbonnière, L., Bernard, M., et al. (2011). The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence. *Science* 334, 1727–1731.
- Androdias, G., Reynolds, R., Chanal, M., Ritleng, C., Confavreux, C., and Nataf, S. (2010). Meningeal T cells associate with diffuse axonal loss in multiple sclerosis spinal cords. *Ann. Neurol.* 68, 465–476.
- Angelini, D.F., Serafini, B., Piras, E., Severa, M., Coccia, E.M., Rosicarelli, B., Ruggieri, S., Gasperini, C., Buttari, F., Centonze, D., et al. (2013). Increased CD8+ T cell response to Epstein-Barr virus lytic antigens in the active phase of multiple sclerosis. *PLoS Pathog.* 9, e1003220.
- 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. Baltim. Md 1950* 177, 5574–5584.
- Argaw, A.T., Gurfein, B.T., Zhang, Y., Zameer, A., and John, G.R. (2009). VEGF-mediated disruption of endothelial CLN-5 promotes blood-brain barrier breakdown. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106, 1977–1982.
- Argaw, A.T., Asp, L., Zhang, J., Navrazhina, K., Pham, T., Mariani, J.N., Mahase, S., Dutta, D.J., Seto, J., Kramer, E.G., et al. (2012). Astrocyte-derived VEGF-A drives blood-brain barrier disruption in CNS inflammatory disease. *J. Clin. Invest.* 122, 2454–2468.

Ascherio, A., Munger, K.L., and Simon, K.C. (2010). Vitamin D and multiple sclerosis. *Lancet Neurol.* 9, 599–612.

Attfield, K.E., and Fugger, L. (2013). TCR transgenic mice that shed light on immune and environmental regulators in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 190, 3015–3017.

Babbe, H., Roers, A., Waisman, A., Lassmann, H., Goebels, N., Hohlfeld, R., Friese, M., Schröder, R., Deckert, M., Schmidt, S., et al. (2000). Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* 192, 393–404.

Bachoo, R.M., Kim, R.S., Ligon, K.L., Maher, E.A., Brennan, C., Billings, N., Chan, S., Li, C., Rowitch, D.H., Wong, W.H., et al. (2004). Molecular diversity of astrocytes with implications for neurological disorders. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101, 8384–8389.

Bahbouhi, B., Berthelot, L., Pettré, S., Michel, L., Wiertlewski, S., Weksler, B., Romero, I.-A., Miller, F., Couraud, P.-O., Brouard, S., et al. (2009). Peripheral blood CD4+ T lymphocytes from multiple sclerosis patients are characterized by higher PSGL-1 expression and transmigration capacity across a human blood-brain barrier-derived endothelial cell line. *J. Leukoc. Biol.* 86, 1049–1063.

Baranzini, S.E., Jeong, M.C., Butunoi, C., Murray, R.S., Bernard, C.C., and Oksenberg, J.R. (1999). B cell repertoire diversity and clonal expansion in multiple sclerosis brain lesions. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 163, 5133–5144.

Baranzini, S.E., Bernard, C.C.A., and Oksenberg, J.R. (2005). Modular transcriptional activity characterizes the initiation and progression of autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 174, 7412–7422.

Barcellos, L.F., Oksenberg, J.R., Begovich, A.B., Martin, E.R., Schmidt, S., Vittinghoff, E., Goodin, D.S., Pelletier, D., Lincoln, R.R., Bucher, P., et al. (2003). HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course. *Am. J. Hum. Genet.* 72, 710–716.

Barcellos, L.F., Sawcer, S., Ramsay, P.P., Baranzini, S.E., Thomson, G., Briggs, F., Cree, B.C.A., Begovich, A.B., Villoslada, P., Montalban, X., et al. (2006). Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis. *Hum. Mol. Genet.* 15, 2813–2824.

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

Bechmann, I., and Nitsch, R. (2001). Plasticity following lesion: help and harm from the immune system. *Restor. Neurol. Neurosci.* 19, 189–198.

- Berer, K., Mues, M., Koutrolos, M., Rasbi, Z.A., Boziki, M., Johner, C., Wekerle, H., and Krishnamoorthy, G. (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479, 538–541.
- Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S.J., Sobel, R.A., Glimcher, L.H., and Kuchroo, V.K. (2004). Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* 200, 79–87.
- Bettelli, E., Carrier, Y., Gao, W., Korn, T., Strom, T.B., Oukka, M., Weiner, H.L., and Kuchroo, V.K. (2006a). Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441, 235–238.
- Bettelli, E., Baeten, D., Jäger, A., Sobel, R.A., and Kuchroo, V.K. (2006b). Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T and B cells cooperate to induce a Devic-like disease in mice. *J. Clin. Invest.* 116, 2393–2402.
- Bettini, M., Rosenthal, K., and Evavold, B.D. (2009a). Pathogenic MOG-reactive CD8+ T cells require MOG-reactive CD4+ T cells for sustained CNS inflammation during chronic EAE. *J. Neuroimmunol.* 213, 60–68.
- Bettini, M., Rosenthal, K., and Evavold, B.D. (2009b). Pathogenic MOG-reactive CD8+ T cells require MOG-reactive CD4+ T cells for sustained CNS inflammation during chronic EAE. *J. Neuroimmunol.* 213, 60–68.
- Bos, R., Marquardt, K.L., Cheung, J., and Sherman, L.A. (2012). Functional differences between low- and high-affinity CD8(+) T cells in the tumor environment. *Oncoimmunology* 1, 1239–1247.
- Boulton, M., Flessner, M., Armstrong, D., Hay, J., and Johnston, M. (1998). Determination of volumetric cerebrospinal fluid absorption into extracranial lymphatics in sheep. *Am. J. Physiol.* 274, R88–96.
- Brabb, T., Goldrath, A.W., von Dassow, P., Paez, A., Liggitt, H.D., and Goverman, J. (1997). Triggers of autoimmune disease in a murine TCR-transgenic model for multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 159, 497–507.
- Brambilla, R., Bracchi-Ricard, V., Hu, W.-H., Frydel, B., Bramwell, A., Karmally, S., Green, E.J., and Bethea, J.R. (2005). Inhibition of astroglial nuclear factor kappaB reduces inflammation and improves functional recovery after spinal cord injury. *J. Exp. Med.* 202, 145–156.
- Brambilla, R., Hurtado, A., Persaud, T., Esham, K., Pearse, D.D., Oudega, M., and Bethea, J.R. (2009). Transgenic inhibition of astroglial NF-kappa B leads to increased axonal sparing and sprouting following spinal cord injury. *J. Neurochem.* 110, 765–778.

- Brambilla, R., Morton, P.D., Ashbaugh, J.J., Karmally, S., Lambertsen, K.L., and Bethea, J.R. (2014). Astrocytes play a key role in EAE pathophysiology by orchestrating in the CNS the inflammatory response of resident and peripheral immune cells and by suppressing remyelination. *Glia* 62, 452–467.
- Brosnan, C.F., and Raine, C.S. (2013). The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia* 61, 453–465.
- Brown, A.L., and Smith, D.W. (2009). Improved RNA preservation for immunolabeling and laser microdissection. *RNA New York N* 15, 2364–2374.
- Brucklacher-Waldert, V., Stuermer, K., Kolster, M., Wolthausen, J., and Tolosa, E. (2009). Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* 132, 3329–3341.
- Von Büdingen, H.-C., Bar-Or, A., and Zamvil, S.S. (2011). B cells in multiple sclerosis: connecting the dots. *Curr. Opin. Immunol.* 23, 713–720.
- Buschmann, J.P., Berger, K., Awad, H., Clarner, T., Beyer, C., and Kipp, M. (2012). Inflammatory response and chemokine expression in the white matter corpus callosum and gray matter cortex region during cuprizone-induced demyelination. *J. Mol. Neurosci.* MN 48, 66–76.
- Bush, T.G., Puvanachandra, N., Horner, C.H., Polito, A., Ostefeld, T., Svendsen, C.N., Mucke, L., Johnson, M.H., and Sofroniew, M.V. (1999). Leukocyte infiltration, neuronal degeneration, and neurite outgrowth after ablation of scar-forming, reactive astrocytes in adult transgenic mice. *Neuron* 23, 297–308.
- Bushong, E.A., Martone, M.E., Jones, Y.Z., and Ellisman, M.H. (2002). Protoplasmic astrocytes in CA1 stratum radiatum occupy separate anatomical domains. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 22, 183–192.
- Cabarrocas, J., Bauer, J., Piaggio, E., Liblau, R., and Lassmann, H. (2003). Effective and selective immune surveillance of the brain by MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *Eur. J. Immunol.* 33, 1174–1182.
- Cahoy, J.D., Emery, B., Kaushal, A., Foo, L.C., Zamanian, J.L., Christopherson, K.S., Xing, Y., Lubischer, J.L., Krieg, P.A., Krupenko, S.A., et al. (2008). A transcriptome database for astrocytes, neurons, and oligodendrocytes: a new resource for understanding brain development and function. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 264–278.
- Campbell, I.L., Hofer, M.J., and Pagenstecher, A. (2010). Transgenic models for cytokine-induced neurological disease. *Biochim. Biophys. Acta* 1802, 903–917.

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

Dal Canto MC, null, Kim, null, Miller, null, and Melvold, null (1996). Theiler's Murine Encephalomyelitis Virus (TMEV)-Induced Demyelination: A Model for Human Multiple Sclerosis. *Methods San Diego Calif* *10*, 453–461.

Cassan, C., Piaggio, E., Zappulla, J.P., Mars, L.T., Couturier, N., Bucciarelli, F., Desbois, S., Bauer, J., Gonzalez-Dunia, D., and Liblau, R.S. (2006). Pertussis toxin reduces the number of splenic Foxp3+ regulatory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *177*, 1552–1560.

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

Choi, C., and Benveniste, E.N. (2004). Fas ligand/Fas system in the brain: regulator of immune and apoptotic responses. *Brain Res. Brain Res. Rev.* *44*, 65–81.

Choi, J.W., Gardell, S.E., Herr, D.R., Rivera, R., Lee, C.-W., Noguchi, K., Teo, S.T., Yung, Y.C., Lu, M., Kennedy, G., et al. (2011). FTY720 (fingolimod) efficacy in an animal model of multiple sclerosis requires astrocyte sphingosine 1-phosphate receptor 1 (S1P1) modulation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *108*, 751–756.

Coffey, J.C., and McDermott, K.W. (1997). The regional distribution of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) in the developing rat CNS: an in vivo immunohistochemical study. *J. Neurocytol.* *26*, 149–161.

Coles, A.J., Cox, A., Le Page, E., Jones, J., Trip, S.A., Deans, J., Seaman, S., Miller, D.H., Hale, G., Waldmann, H., et al. (2006). The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: evidence from monoclonal antibody therapy. *J. Neurol.* *253*, 98–108.

Compston, A., and Coles, A. (2002). Multiple sclerosis. *Lancet* *359*, 1221–1231.

Confavreux, C., Vukusic, S., Moreau, T., and Adeleine, P. (2000). Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* *343*, 1430–1438.

Cosmi, L., Liotta, F., Maggi, E., Romagnani, S., and Annunziato, F. (2014). Th17 and Non-Classic Th1 Cells in Chronic Inflammatory Disorders: Two Sides of the Same Coin. *Int. Arch. Allergy Immunol.* *164*, 171–177.

Daginakatte, G.C., Gadzinski, A., Emnett, R.J., Stark, J.L., Gonzales, E.R., Yan, P., Lee, J.-M., Cross, A.H., and Gutmann, D.H. (2008). Expression profiling identifies a molecular signature of reactive astrocytes stimulated by cyclic AMP or proinflammatory cytokines. *Exp. Neurol.* *210*, 261–267.

- Dai, H., Wan, N., Zhang, S., Moore, Y., Wan, F., and Dai, Z. (2010). Cutting edge: programmed death-1 defines CD8⁺CD122⁺ T cells as regulatory versus memory T cells. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *185*, 803–807.
- Danbolt, N.C. (2001). Glutamate uptake. *Prog. Neurobiol.* *65*, 1–105.
- Delarasse, C., Smith, P., Baker, D., and Amor, S. (2013). Novel pathogenic epitopes of myelin oligodendrocyte glycoprotein induce experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Immunology* *140*, 456–464.
- Dong, Y., and Benveniste, E.N. (2001). Immune function of astrocytes. *Glia* *36*, 180–190.
- Drögemüller, K., Helmuth, U., Brunn, A., Sakowicz-Burkiewicz, M., Gutmann, D.H., Mueller, W., Deckert, M., and Schlüter, D. (2008). Astrocyte gp130 expression is critical for the control of *Toxoplasma* encephalitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *181*, 2683–2693.
- Duddy, M.E., Alter, A., and Bar-Or, A. (2004). Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 3422–3427.
- Eddleston, M., and Mucke, L. (1993). Molecular profile of reactive astrocytes—Implications for their role in neurologic disease. *Neuroscience* *54*, 15–36.
- Elong Ngonu, A., Pettré, S., Salou, M., Bahbouhi, B., Soullou, J.-P., Brouard, S., and Laplaud, D.-A. (2012). Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *144*, 117–126.
- Eng, L.F., Ghirnikar, R.S., and Lee, Y.L. (2000). Glial fibrillary acidic protein: GFAP-thirty-one years (1969-2000). *Neurochem. Res.* *25*, 1439–1451.
- Erälinna, J.P., Soilu-Hänninen, M., Röyttä, M., Ilonen, J., Mäkelä, A., and Salonen, R. (1994). Facilitation of experimental allergic encephalomyelitis by irradiation and virus infection: role of inflammatory cells. *J. Neuroimmunol.* *55*, 81–90.
- Fancy, S.P.J., Kotter, M.R., Harrington, E.P., Huang, J.K., Zhao, C., Rowitch, D.H., and Franklin, R.J.M. (2010). Overcoming remyelination failure in multiple sclerosis and other myelin disorders. *Exp. Neurol.* *225*, 18–23.
- Farina, C., Aloisi, F., and Meinl, E. (2007). Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol.* *28*, 138–145.

- Faulkner, J.R., Herrmann, J.E., Woo, M.J., Tansey, K.E., Doan, N.B., and Sofroniew, M.V. (2004). Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 24, 2143–2155.
- Fawcett, J.W. (2006). Novel strategies for protection and repair of the central nervous system. *Clin. Med. Lond. Engl.* 6, 598–603.
- Fend, F., Emmert-Buck, M.R., Chuaqui, R., Cole, K., Lee, J., Liotta, L.A., and Raffeld, M. (1999). Immuno-LCM: laser capture microdissection of immunostained frozen sections for mRNA analysis. *Am. J. Pathol.* 154, 61–66.
- 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. Baltim. Md 1950* 156, 5–7.
- Fernandes, A., Miller-Fleming, L., and Pais, T.F. (2014). Microglia and inflammation: conspiracy, controversy or control? *Cell. Mol. Life Sci.* 1–17.
- Ferraiuolo, L., Heath, P.R., Holden, H., Kasher, P., Kirby, J., and Shaw, P.J. (2007). Microarray analysis of the cellular pathways involved in the adaptation to and progression of motor neuron injury in the SOD1 G93A mouse model of familial ALS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 27, 9201–9219.
- Fitzgerald, D.C., Zhang, G.-X., El-Behi, M., Fonseca-Kelly, Z., Li, H., Yu, S., Saris, C.J.M., Gran, B., Ciric, B., and Rostami, A. (2007). Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat. Immunol.* 8, 1372–1379.
- Fogdell-Hahn, A., Ligers, A., Grønning, M., Hillert, J., and Olerup, O. (2000). Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens* 55, 140–148.
- Ford, M.L., and Evavold, B.D. (2005). Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8⁺ T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* 35, 76–85.
- Francischetti, I., Moreno, J.B., Scholz, M., and Yoshida, W.B. (2010). Leukocytes and the inflammatory response in ischemia-reperfusion injury. *Rev. Bras. Cir. Cardiovasc. Órgão Of. Soc. Bras. Cir. Cardiovasc.* 25, 575–584.
- Friese, M.A., and Fugger, L. (2009). Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* 66, 132–141.

- Friese, M.A., Jakobsen, K.B., Friis, L., Etzensperger, R., Craner, M.J., McMahon, R.M., Jensen, L.T., Huygelen, V., Jones, E.Y., Bell, J.I., et al. (2008). Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8⁺ T cells in multiple sclerosis. *Nat. Med.* *14*, 1227–1235.
- Fromont, A., Binguet, C., Sauleau, E., Fournel, I., Despalins, R., Rollet, F., Weill, A., Clerc, L., Bonithon-Kopp, C., and Moreau, T. (2012). National estimate of multiple sclerosis incidence in France (2001-2007). *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *18*, 1108–1115.
- Fugger, L., Friese, M.A., and Bell, J.I. (2009). From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* *9*, 408–417.
- Fukaura, H., and Kikuchi, S. (2003). [IL-18 in multiple sclerosis]. *Nihon Rinsho Jpn. J. Clin. Med.* *61*, 1416–1421.
- Fulmer, C.G., VonDran, M.W., Stillman, A.A., Huang, Y., Hempstead, B.L., and Dreyfus, C.F. (2014). Astrocyte-derived BDNF supports myelin protein synthesis after cuprizone-induced demyelination. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *34*, 8186–8196.
- Gaudineau, B., Fougère, M., Guaddachi, F., Lemoine, F., de la Grange, P., and Jauliac, S. (2012). Lipocalin 2, the TNF-like receptor TWEAKR and its ligand TWEAK act downstream of NFAT1 to regulate breast cancer cell invasion. *J. Cell Sci.* *125*, 4475–4486.
- Genain, C.P., Cannella, B., Hauser, S.L., and Raine, C.S. (1999). Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat. Med.* *5*, 170–175.
- Giaume, C., Kirchhoff, F., Matute, C., Reichenbach, A., and Verkhratsky, A. (2007). Glia: the fulcrum of brain diseases. *Cell Death Differ.* *14*, 1324–1335.
- Gimenez, M.A.T., Sim, J.E., and Russell, J.H. (2004). TNFR1-dependent VCAM-1 expression by astrocytes exposes the CNS to destructive inflammation. *J. Neuroimmunol.* *151*, 116–125.
- Gimsa, U., Mitchison, N.A., and Brunner-Weinzierl, M.C. (2013). Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation. *Mediators Inflamm.* *2013*, 320519.
- Ginhoux, F., Greter, M., Leboeuf, M., Nandi, S., See, P., Gokhan, S., Mehler, M.F., Conway, S.J., Ng, L.G., Stanley, E.R., et al. (2010). Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science* *330*, 841–845.
- Giraud, S.N., Caron, C.M., Pham-Dinh, D., Kitabgi, P., and Nicot, A.B. (2010). Estradiol inhibits ongoing autoimmune neuroinflammation and NFκB-dependent CCL2 expression in reactive astrocytes. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *107*, 8416–8421.

- Gjerdrum, L.M., Abrahamsen, H.N., Villegas, B., Sorensen, B.S., Schmidt, H., and Hamilton-Dutoit, S.J. (2004). The influence of immunohistochemistry on mRNA recovery from microdissected frozen and formalin-fixed, paraffin-embedded sections. *Diagn. Mol. Pathol. Am. J. Surg. Pathol. Part B* 13, 224–233.
- 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 J. Neurol.* 129, 1953–1971.
- Gourraud, P.-A., Harbo, H.F., Hauser, S.L., and Baranzini, S.E. (2012). The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunol. Rev.* 248, 87–103.
- Gu, X.-L., Long, C.-X., Sun, L., Xie, C., Lin, X., and Cai, H. (2010). Astrocytic expression of Parkinson's disease-related A53T alpha-synuclein causes neurodegeneration in mice. *Mol. Brain* 3, 12.
- Hamby, M.E., and Sofroniew, M.V. (2010). Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 7, 494–506.
- Harp, C.T., Ireland, S., Davis, L.S., Remington, G., Cassidy, B., Cravens, P.D., Stuve, O., Lovett-Racke, A.E., Eagar, T.N., Greenberg, B.M., et al. (2010). Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN- γ production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur. J. Immunol.* 40, 2942–2956.
- Harris, L.W., Wayland, M., Lan, M., Ryan, M., Giger, T., Lockstone, H., Wuethrich, I., Mimmack, M., Wang, L., Kotter, M., et al. (2008). The cerebral microvasculature in schizophrenia: a laser capture microdissection study. *PLoS ONE* 3, e3964.
- Hatterer, E. (2006). How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood* 107, 806–812.
- Hauser, S.L., Waubant, E., Arnold, D.L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R.J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., et al. (2008). B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* 358, 676–688.
- Herrmann, J.E., Imura, T., Song, B., Qi, J., Ao, Y., Nguyen, T.K., Korsak, R.A., Takeda, K., Akira, S., and Sofroniew, M.V. (2008). STAT3 is a critical regulator of astrogliosis and scar formation after spinal cord injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* 28, 7231–7243.
- Van Heteren, J.T., Rozenberg, F., Aronica, E., Troost, D., Lebon, P., and Kuijpers, T.W. (2008). Astrocytes produce interferon-alpha and CXCL10, but not IL-6 or CXCL8, in Aicardi-Goutières syndrome. *Glia* 56, 568–578.

- Hindinger, C., Bergmann, C.C., Hinton, D.R., Phares, T.W., Parra, G.I., Hussain, S., Savarin, C., Atkinson, R.D., and Stohlman, S.A. (2012). IFN- γ signaling to astrocytes protects from autoimmune mediated neurological disability. *PLoS ONE* 7, e42088.
- Hirst, C.L., Pace, A., Pickersgill, T.P., Jones, R., McLean, B.N., Zajicek, J.P., Scolding, N.J., and Robertson, N.P. (2008). Campath 1-H treatment in patients with aggressive relapsing remitting multiple sclerosis. *J. Neurol.* 255, 231–238.
- Hofstetter, H., Gold, R., and Hartung, H.-P. (2009). Th17 Cells in MS and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Int. MS J. MS Forum* 16, 12–18.
- Hofstetter, H.H., Ibrahim, S.M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K.V., and Gold, R. (2005). Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell. Immunol.* 237, 123–130.
- Höftberger, R., Aboul-Enein, F., Brueck, W., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Schmidbauer, M., Jellinger, K., and Lassmann, H. (2004). Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol. Zurich Switz.* 14, 43–50.
- Howland, D.S., Liu, J., She, Y., Goad, B., Maragakis, N.J., Kim, B., Erickson, J., Kulik, J., DeVito, L., Psaltis, G., et al. (2002). Focal loss of the glutamate transporter EAAT2 in a transgenic rat model of SOD1 mutant-mediated amyotrophic lateral sclerosis (ALS). *Proc. Natl. Acad. Sci.* 99, 1604–1609.
- Huseby, E.S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlén, C., and Goverman, J. (2001). A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J. Exp. Med.* 194, 669–676.
- Ifergan, I., Kebir, H., Alvarez, J.I., Marceau, G., Bernard, M., Bourbonnière, L., Poirier, J., Duquette, P., Talbot, P.J., Arbour, N., et al. (2011). Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on $\alpha 4$ integrin. *Brain J. Neurol.* 134, 3560–3577.
- International Multiple Sclerosis Genetics Consortium, Wellcome Trust Case Control Consortium 2, Sawcer, S., Hellenthal, G., Pirinen, M., Spencer, C.C.A., Patsopoulos, N.A., Moutsianas, L., Dilthey, A., Su, Z., et al. (2011). Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* 476, 214–219.
- Ishii, M., and Maeda, N. (2008). Oversulfated chondroitin sulfate plays critical roles in the neuronal migration in the cerebral cortex. *J. Biol. Chem.* 283, 32610–32620.

- Ivanov, I.I., McKenzie, B.S., Zhou, L., Tadokoro, C.E., Lepelley, A., Lafaille, J.J., Cua, D.J., and Littman, D.R. (2006). The orphan nuclear receptor ROR γ directs the differentiation program of proinflammatory IL-17⁺ T helper cells. *Cell* *126*, 1121–1133.
- Jacobsen, M., Cepok, S., Quak, E., Happel, M., Gaber, R., Ziegler, A., Schock, S., Oertel, W.H., Sommer, N., and Hemmer, B. (2002). Oligoclonal expansion of memory CD8⁺ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain J. Neurol.* *125*, 538–550.
- Jang, E., Kim, J.-H., Lee, S., Kim, J.-H., Seo, J.-W., Jin, M., Lee, M.-G., Jang, I.-S., Lee, W.-H., and Suk, K. (2013). Phenotypic Polarization of Activated Astrocytes: The Critical Role of Lipocalin-2 in the Classical Inflammatory Activation of Astrocytes. *J. Immunol.* *191*, 5204–5219.
- Ji, Q., and Goverman, J. (2007). Experimental autoimmune encephalomyelitis mediated by CD8⁺ T cells. *Ann. N. Y. Acad. Sci.* *1103*, 157–166.
- Jiang, H., Curran, S., Ruiz-Vazquez, E., Liang, B., Winchester, R., and Chess, L. (2003). Regulatory CD8⁺ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V beta repertoire during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *100*, 8378–8383.
- Jiang, Z., Jiang, J.X., and Zhang, G.-X. (2014). Macrophages: a double-edged sword in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Immunol. Lett.* *160*, 17–22.
- John, G.R., Shankar, S.L., Shafit-Zagardo, B., Massimi, A., Lee, S.C., Raine, C.S., and Brosnan, C.F. (2002). Multiple sclerosis: re-expression of a developmental pathway that restricts oligodendrocyte maturation. *Nat. Med.* *8*, 1115–1121.
- John, G.R., Lee, S.C., Song, X., Rivieccio, M., and Brosnan, C.F. (2005). IL-1-regulated responses in astrocytes: relevance to injury and recovery. *Glia* *49*, 161–176.
- Junker, A., Ivanidze, J., Malotka, J., Eiglmeier, I., Lassmann, H., Wekerle, H., Meinl, E., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2007). Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain J. Neurol.* *130*, 2789–2799.
- Jurewicz, A., Biddison, W.E., and Antel, J.P. (1998). MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *160*, 3056–3059.
- Kang, B.-S., Lyman, M.A., and Kim, B.S. (2002). The majority of infiltrating CD8⁺ T cells in the central nervous system of susceptible SJL/J mice infected with Theiler's virus are virus specific and fully functional. *J. Virol.* *76*, 6577–6585.
- Kang, Z., Altuntas, C.Z., Gulen, M.F., Liu, C., Giltiy, N., Qin, H., Liu, L., Qian, W., Ransohoff, R.M., Bergmann, C., et al. (2010). Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-

induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 32, 414–425.

Kerfoot, S.M., Long, E.M., Hickey, M.J., Andonegui, G., Lapointe, B.M., Zanardo, R.C.O., Bonder, C., James, W.G., Robbins, S.M., and Kubes, P. (2004). TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 173, 7070–7077.

Kim, S.U., and de Vellis, J. (2005). Microglia in health and disease. *J. Neurosci. Res.* 81, 302–313.

Kimball, S., Vieth, R., Dosch, H.-M., Bar-Or, A., Cheung, R., Gagne, D., O'Connor, P., D'Souza, C., Ursell, M., and Burton, J.M. (2011). Cholecalciferol plus calcium suppresses abnormal PBMC reactivity in patients with multiple sclerosis. *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 96, 2826–2834.

Kimelberg, H.K., and Nedergaard, M. (2010). Functions of astrocytes and their potential as therapeutic targets. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* 7, 338–353.

Kokura, S., Wolf, R.E., Yoshikawa, T., Granger, D.N., and Aw, T.Y. (2000). T-lymphocyte-derived tumor necrosis factor exacerbates anoxia-reoxygenation-induced neutrophil-endothelial cell adhesion. *Circ. Res.* 86, 205–213.

Kort, J.J., Kawamura, K., Fugger, L., Weissert, R., and Forsthuber, T.G. (2006). Efficient presentation of myelin oligodendrocyte glycoprotein peptides but not protein by astrocytes from HLA-DR2 and HLA-DR4 transgenic mice. *J. Neuroimmunol.* 173, 23–34.

Kriegstein, A., and Alvarez-Buylla, A. (2009). The glial nature of embryonic and adult neural stem cells. *Annu. Rev. Neurosci.* 32, 149–184.

Krishnamoorthy, G., Lassmann, H., Wekerle, H., and Holz, A. (2006). Spontaneous opticospinal encephalomyelitis in a double-transgenic mouse model of autoimmune T cell/B cell cooperation. *J. Clin. Invest.* 116, 2385–2392.

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

Laplaud, D.-A., and Confavreux, C. (2006). [Etiology of multiple sclerosis]. *Rev. Prat.* 56, 1306–1312.

Lassmann, H. (2007). Experimental models of multiple sclerosis. *Rev. Neurol. (Paris)* 163, 651–655.

- Lawson, L.J., Perry, V.H., Dri, P., and Gordon, S. (1990). Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience* 39, 151–170.
- Lee, S., Park, J.-Y., Lee, W.-H., Kim, H., Park, H.-C., Mori, K., and Suk, K. (2009). Lipocalin-2 Is an Autocrine Mediator of Reactive Astrocytosis. *J. Neurosci.* 29, 234–249.
- Lee, S.C., Moore, G.R., Golenwsky, G., and Raine, C.S. (1990). Multiple sclerosis: a role for astroglia in active demyelination suggested by class II MHC expression and ultrastructural study. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 49, 122–136.
- Leuenberger, T., Paterka, M., Reuter, E., Herz, J., Niesner, R.A., Radbruch, H., Bopp, T., Zipp, F., and Siffrin, V. (2013). The role of CD8⁺ T cells and their local interaction with CD4⁺ T cells in myelin oligodendrocyte glycoprotein35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 191, 4960–4968.
- Levin, L.I., Munger, K.L., Rubertone, M.V., Peck, C.A., Lennette, E.T., Spiegelman, D., and Ascherio, A. (2005). Temporal relationship between elevation of epstein-barr virus antibody titers and initial onset of neurological symptoms in multiple sclerosis. *JAMA J. Am. Med. Assoc.* 293, 2496–2500.
- Liang, W.S., Dunckley, T., Beach, T.G., Grover, A., Mastroeni, D., Ramsey, K., Caselli, R.J., Kukull, W.A., McKeel, D., Morris, J.C., et al. (2008). Altered neuronal gene expression in brain regions differentially affected by Alzheimer's disease: a reference data set. *Physiol. Genomics* 33, 240–256.
- Lieb, K., Engels, S., and Fiebich, B.L. (2003). Inhibition of LPS-induced iNOS and NO synthesis in primary rat microglial cells. *Neurochem. Int.* 42, 131–137.
- Liedtke, W., Edelman, W., Bieri, P.L., Chiu, F.C., Cowan, N.J., Kucherlapati, R., and Raine, C.S. (1996). GFAP is necessary for the integrity of CNS white matter architecture and long-term maintenance of myelination. *Neuron* 17, 607–615.
- Liedtke, W., Edelman, W., Chiu, F.C., Kucherlapati, R., and Raine, C.S. (1998). Experimental autoimmune encephalomyelitis in mice lacking glial fibrillary acidic protein is characterized by a more severe clinical course and an infiltrative central nervous system lesion. *Am. J. Pathol.* 152, 251–259.
- Lieury, A., Chanal, M., Androdias, G., Reynolds, R., Cavagna, S., Giraudon, P., Confavreux, C., and Nataf, S. (2014). Tissue remodeling in periplaque regions of multiple sclerosis spinal cord lesions. *Glia* 62, 1645–1658.
- Linington, C., Bradl, M., Lassmann, H., Brunner, C., and Vass, K. (1988). Augmentation of demyelination in rat acute allergic encephalomyelitis by circulating mouse monoclonal antibodies directed against a myelin/oligodendrocyte glycoprotein. *Am. J. Pathol.* 130, 443–454.

- 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.
- Lipton, H.L. (1975). Theiler's virus infection in mice: an unusual biphasic disease process leading to demyelination. *Infect. Immun.* *11*, 1147–1155.
- Lipton, H.L., Kallio, P., and Jelachich, M.L. (2005). Simplified quantitative analysis of spinal cord cells from Theiler's virus-infected mice without the requirement for myelin debris removal. *J. Immunol. Methods* *299*, 107–115.
- Liu, H., MacKenzie-Graham, A.J., Kim, S., and Voskuhl, R.R. (2001). Mice resistant to experimental autoimmune encephalomyelitis have increased thymic expression of myelin basic protein and increased MBP specific T cell tolerance. *J. Neuroimmunol.* *115*, 118–126.
- Lou, Y.H., Park, K.K., Agersborg, S., Alard, P., and Tung, K.S. (2000). Retargeting T cell-mediated inflammation: a new perspective on autoantibody action. *J. Immunol. Baltim. Md* *1950* *164*, 5251–5257.
- Lovatt, D., Sonnewald, U., Waagepetersen, H.S., Schousboe, A., He, W., Lin, J.H.-C., Han, X., Takano, T., Wang, S., Sim, F.J., et al. (2007). The transcriptome and metabolic gene signature of protoplasmic astrocytes in the adult murine cortex. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *27*, 12255–12266.
- Lowther, D.E., and Hafler, D.A. (2012). Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol. Rev.* *248*, 156–169.
- Lucchinetti, C., Brück, W., Parisi, J., Scheithauer, B., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (2000). Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Ann. Neurol.* *47*, 707–717.
- Luo, J., Ho, P., Steinman, L., and Wyss-Coray, T. (2008). Bioluminescence in vivo imaging of autoimmune encephalomyelitis predicts disease. *J. Neuroinflammation* *5*, 6.
- Lyman, M.A., Myoung, J., Mohindru, M., and Kim, B.S. (2004). Quantitative, not qualitative, differences in CD8(+) T cell responses to Theiler's murine encephalomyelitis virus between resistant C57BL/6 and susceptible SJL/J mice. *Eur. J. Immunol.* *34*, 2730–2739.
- Lynch, M.A. (2009). The multifaceted profile of activated microglia. *Mol. Neurobiol.* *40*, 139–156.
- Madsen, L.S., Andersson, E.C., Jansson, L., krogsgaard, M., Andersen, C.B., Engberg, J., Strominger, J.L., Svejgaard, A., Hjorth, J.P., Holmdahl, R., et al. (1999). A humanized model for multiple sclerosis using HLA-DR2 and a human T-cell receptor. *Nat. Genet.* *23*, 343–347.

- Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., and Aloisi, F. (2007). Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain J. Neurol.* *130*, 1089–1104.
- Magnus, T., Chan, A., Linker, R.A., Toyka, K.V., and Gold, R. (2002). Astrocytes are less efficient in the removal of apoptotic lymphocytes than microglia cells: implications for the role of glial cells in the inflamed central nervous system. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *61*, 760–766.
- Mangalam, A.K., Khare, M., Krco, C., Rodriguez, M., and David, C. (2004). Identification of T cell epitopes on human proteolipid protein and induction of experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA class II-transgenic mice. *Eur. J. Immunol.* *34*, 280–290.
- Mars, L.T., Bauer, J., Gross, D.A., Bucciarelli, F., Firat, H., Hudrisier, D., Lemonnier, F., Kosmatopoulos, K., and Liblau, R.S. (2007). CD8 T cell responses to myelin oligodendrocyte glycoprotein-derived peptides in humanized HLA-A*0201-transgenic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *179*, 5090–5098.
- Mason, D. (1991). Genetic variation in the stress response: susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis and implications for human inflammatory disease. *Immunol. Today* *12*, 57–60.
- Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Fujimoto, M., and Tedder, T.F. (2008). Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J. Clin. Invest.* *118*, 3420–3430.
- Matusevicius, D., Kivisäkk, P., He, B., Kostulas, N., Ozenci, V., Fredrikson, S., and Link, H. (1999). Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* *5*, 101–104.
- Matyszak, M.K., Townsend, M.J., and Perry, V.H. (1997). Ultrastructural studies of an immune-mediated inflammatory response in the CNS parenchyma directed against a non-CNS antigen. *Neuroscience* *78*, 549–560.
- McCarthy, K.D., and de Vellis, J. (1980). Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. *J. Cell Biol.* *85*, 890–902.
- McDonnell, G.V., Mawhinney, H., Graham, C.A., Hawkins, S.A., and Middleton, D. (1999). A study of the HLA-DR region in clinical subgroups of multiple sclerosis and its influence on prognosis. *J. Neurol. Sci.* *165*, 77–83.
- Mead, R.J., Singhrao, S.K., Neal, J.W., Lassmann, H., and Morgan, B.P. (2002). The membrane attack complex of complement causes severe demyelination associated with acute axonal injury. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *168*, 458–465.

Medana, I., Martinic, M.A., Wekerle, H., and Neumann, H. (2001). Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes. *Am. J. Pathol.* *159*, 809–815.

Medana, I.M., Gallimore, A., Oxenius, A., Martinic, M.M., Wekerle, H., and Neumann, H. (2000). MHC class I-restricted killing of neurons by virus-specific CD8⁺ T lymphocytes is effected through the Fas/FasL, but not the perforin pathway. *Eur. J. Immunol.* *30*, 3623–3633.

Medawar, P.B. (1948). Tests by tissue culture methods on the nature of immunity to transplanted skin. *Q. J. Microsc. Sci.* *89*, 239–252.

Michel, L., Berthelot, L., Pettré, S., Wiertlewski, S., Lefrère, F., Braudeau, C., Brouard, S., Soullillou, J.-P., and Laplaud, D.-A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J. Clin. Invest.* *118*, 3411–3419.

Miller, S.D., Karpus, W.J., and Davidson, T.S. (2007). Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in the Mouse. *Curr. Protoc. Immunol.* Ed. John E Coligan *AI CHAPTER, Unit–15.1.*

Min, K.-J., Yang, M., Kim, S.-U., Jou, I., and Joe, E. (2006). Astrocytes induce hemoxygenase-1 expression in microglia: a feasible mechanism for preventing excessive brain inflammation. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *26*, 1880–1887.

Mittelbronn, M., Dietz, K., Schluesener, H.J., and Meyermann, R. (2001). Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *101*, 249–255.

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

Montes, M., Zhang, X., Berthelot, L., Laplaud, D.-A., Brouard, S., Jin, J., Rogan, S., Armao, D., Jewells, V., Soullillou, J.-P., et al. (2009). Oligoclonal myelin-reactive T-cell infiltrates derived from multiple sclerosis lesions are enriched in Th17 cells. *Clin. Immunol. Orlando Fla* *130*, 133–144.

Murphy, A.C., Lalor, S.J., Lynch, M.A., and Mills, K.H.G. (2010). Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain. Behav. Immun.* *24*, 641–651.

Na, S.-Y., Cao, Y., Toben, C., Nitschke, L., Stadelmann, C., Gold, R., Schimpl, A., and Hünig, T. (2008). Naive CD8 T-cells initiate spontaneous autoimmunity to a sequestered model antigen of the central nervous system. *Brain J. Neurol.* *131*, 2353–2365.

Na, S.-Y., Eujen, H., Göbel, K., Meuth, S.G., Martens, K., Wiendl, H., and Hünig, T. (2009). Antigen-specific blockade of lethal CD8 T-cell mediated autoimmunity in a mouse model of multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *182*, 6569–6575.

Na, S.-Y., Hermann, A., Sanchez-Ruiz, M., Storch, A., Deckert, M., and Hünig, T. (2012). Oligodendrocytes enforce immune tolerance of the uninfected brain by purging the peripheral repertoire of autoreactive CD8+ T cells. *Immunity* *37*, 134–146.

Nait-Oumesmar, B., Picard-Riéra, N., Kerninon, C., and Baron-Van Evercooren, A. (2008). The role of SVZ-derived neural precursors in demyelinating diseases: From animal models to multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* *265*, 26–31.

Namer, I.J., Steibel, J., Poulet, P., Mauss, Y., Mohr, M., and Chambron, J. (1994). The role of *Mycobacterium tuberculosis* in experimental allergic encephalomyelitis. *Eur. Neurol.* *34*, 224–227.

Neumann, H., Medana, I.M., Bauer, J., and Lassmann, H. (2002). Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci.* *25*, 313–319.

Ben-Nun, A., and Cohen, I.R. (1981). Vaccination against autoimmune encephalomyelitis (EAE): attenuated autoimmune T lymphocytes confer resistance to induction of active EAE but not to EAE mediated by the intact T lymphocyte line. *Eur. J. Immunol.* *11*, 949–952.

Nylander, A., and Hafler, D.A. (2012). Multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* *122*, 1180–1188.

Oberheim, N.A., Wang, X., Goldman, S., and Nedergaard, M. (2006). Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends Neurosci.* *29*, 547–553.

Okada, S., Nakamura, M., Katoh, H., Miyao, T., Shimazaki, T., Ishii, K., Yamane, J., Yoshimura, A., Iwamoto, Y., Toyama, Y., et al. (2006). Conditional ablation of Stat3 or Socs3 discloses a dual role for reactive astrocytes after spinal cord injury. *Nat. Med.* *12*, 829–834.

Oliveira, A.L.R., Thams, S., Lidman, O., Piehl, F., Hökfelt, T., Kärre, K., Lindå, H., and Cullheim, S. (2004). A role for MHC class I molecules in synaptic plasticity and regeneration of neurons after axotomy. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 17843–17848.

Van Oosten, B.W., Lai, M., Hodgkinson, S., Barkhof, F., Miller, D.H., Moseley, I.F., Thompson, A.J., Rudge, P., McDougall, A., McLeod, J.G., et al. (1997). Treatment of

multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology* 49, 351–357.

Bar-Or, A., Fawaz, L., Fan, B., Darlington, P.J., Rieger, A., Ghorayeb, C., Calabresi, P.A., Waubant, E., Hauser, S.L., Zhang, J., et al. (2010). Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann. Neurol.* 67, 452–461.

Ordway, G.A., Szebeni, A., Duffourc, M.M., Dessus-Babus, S., and Szebeni, K. (2009). Gene expression analyses of neurons, astrocytes, and oligodendrocytes isolated by laser capture microdissection from human brain: detrimental effects of laboratory humidity. *J. Neurosci. Res.* 87, 2430–2438.

Øren, A., Falk, K., Röttschke, O., Bechmann, I., Nitsch, R., and Gimsa, U. (2004). Production of neuroprotective NGF in astrocyte-T helper cell cocultures is upregulated following antigen recognition. *J. Neuroimmunol.* 149, 59–65.

Orton, S.-M., Wald, L., Confavreux, C., Vukusic, S., Krohn, J.P., Ramagopalan, S.V., Herrera, B.M., Sadovnick, A.D., and Ebers, G.C. (2011). Association of UV radiation with multiple sclerosis prevalence and sex ratio in France. *Neurology* 76, 425–431.

Pakpoor, J., Pakpoor, J., Disanto, G., Giovannoni, G., and Ramagopalan, S.V. (2013). Cytomegalovirus and multiple sclerosis risk. *J. Neurol.* 260, 1658–1660.

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

Pekny, M., and Pekna, M. (2004). Astrocyte intermediate filaments in CNS pathologies and regeneration. *J. Pathol.* 204, 428–437.

Pender, M.P. (2011). The essential role of Epstein-Barr virus in the pathogenesis of multiple sclerosis. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* 17, 351–367.

Pender, M.P., Nguyen, K.B., McCombe, P.A., and Kerr, J.F. (1991). Apoptosis in the nervous system in experimental allergic encephalomyelitis. *J. Neurol. Sci.* 104, 81–87.

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

Pirko, I., Cardin, R., Chen, Y., Lohrey, A.K., Lindquist, D.M., Dunn, R.S., Zivadinov, R., and Johnson, A.J. (2012). CMV infection attenuates the disease course in a murine model of multiple sclerosis. *PLoS ONE* 7, e32767.

- Polman, C.H., Reingold, S.C., Edan, G., Filippi, M., Hartung, H.-P., Kappos, L., Lublin, F.D., Metz, L.M., McFarland, H.F., O'Connor, P.W., et al. (2005). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria." *Ann. Neurol.* 58, 840–846.
- Pouly, S., Becher, B., Blain, M., and Antel, J.P. (2000). Interferon-gamma modulates human oligodendrocyte susceptibility to Fas-mediated apoptosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 59, 280–286.
- Qin, Y., Duquette, P., Zhang, Y., Talbot, P., Poole, R., and Antel, J. (1998). Clonal expansion and somatic hypermutation of V(H) genes of B cells from cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J. Clin. Invest.* 102, 1045–1050.
- Quandt, J.A., Baig, M., Yao, K., Kawamura, K., Huh, J., Ludwin, S.K., Bian, H.-J., Bryant, M., Quigley, L., Nagy, Z.A., et al. (2004). Unique clinical and pathological features in HLA-DRB1*0401-restricted MBP 111-129-specific humanized TCR transgenic mice. *J. Exp. Med.* 200, 223–234.
- Quintana, A., Müller, M., Frausto, R.F., Ramos, R., Getts, D.R., Sanz, E., Hofer, M.J., Krauthausen, M., King, N.J.C., Hidalgo, J., et al. (2009). Site-specific production of IL-6 in the central nervous system retargets and enhances the inflammatory response in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* 183, 2079–2088.
- Racadot, E., Rumbach, L., Bataillard, M., Galmiche, J., Henlin, J.-L., Truttmann, M., Herve, P., and Wijdenes, J. (1993). Treatment of Multiple Sclerosis with Anti-CD4 Monoclonal Antibody: A Preliminary Report on B-F5 in 21 Patients. *J. Autoimmun.* 6, 771–786.
- Ramagopalan, S.V., Dyment, D.A., and Ebers, G.C. (2008). Genetic epidemiology: the use of old and new tools for multiple sclerosis. *Trends Neurosci.* 31, 645–652.
- Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu. Rev. Immunol.* 27, 119–145.
- Rawji, K.S., and Yong, V.W. (2013). The benefits and detriments of macrophages/microglia in models of multiple sclerosis. *Clin. Dev. Immunol.* 2013, 948976.
- Roitbak, T., and Syková, E. (1999). Diffusion barriers evoked in the rat cortex by reactive astrogliosis. *Glia* 28, 40–48.
- Rosati, G. (2001). The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update. *Neurol. Sci. Off. J. Ital. Neurol. Soc. Ital. Soc. Clin. Neurophysiol.* 22, 117–139.
- Rothenberg, B.E., and Volland, J.R. (1996). beta2 knockout mice develop parenchymal iron overload: A putative role for class I genes of the major histocompatibility complex in iron metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 93, 1529–1534.

- Rumbach, L., Racadot, E., Armspach, J.P., Namer, I.J., Bonneville, J.F., Wijdenes, J., Marescaux, C., Herve, P., and Chambron, J. (1996). Biological assessment and MRI monitoring of the therapeutic efficacy of a monoclonal anti-T CD4 antibody in multiple sclerosis patients. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl. 1*, 207–212.
- Saas, P., Boucraut, J., Walker, P.R., Quiquerez, A.L., Billot, M., Desplat-Jego, S., Chicheportiche, Y., and Dietrich, P.Y. (2000). TWEAK stimulation of astrocytes and the proinflammatory consequences. *Glia 32*, 102–107.
- Salou, M., Elong Ngonu, A., Garcia, A., Michel, L., and Laplaud, D.-A. (2013). [Adaptative immunity and pathophysiology of multiple sclerosis]. *Rev. Médecine Interne Fondée Par Société Natl. Francaise Médecine Interne 34*, 479–486.
- Sawcer, S., Franklin, R.J.M., and Ban, M. (2014). Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol. 13*, 700–709.
- 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. Baltim. Md 1950 181*, 1617–1621.
- Sellebjerg, F., Christiansen, M., and Garred, P. (1998). MBP, anti-MBP and anti-PLP antibodies, and intrathecal complement activation in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl. 4*, 127–131.
- Serafini, B., Rosicarelli, B., Franciotta, D., Magliozzi, R., Reynolds, R., Cinque, P., Andreoni, L., Trivedi, P., Salvetti, M., Faggioni, A., et al. (2007). Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *J. Exp. Med. 204*, 2899–2912.
- Shatz, C.J. (2009). MHC class I: an unexpected role in neuronal plasticity. *Neuron 64*, 40–45.
- Shi, Z., Okuno, Y., Rifa'i, M., Endharti, A.T., Akane, K., Isobe, K.-I., and Suzuki, H. (2009). Human CD8+CXCR3+ T cells have the same function as murine CD8+CD122+ Treg. *Eur. J. Immunol. 39*, 2106–2119.
- Simpson, J.E., Ince, P.G., Shaw, P.J., Heath, P.R., Raman, R., Garwood, C.J., Gelsthorpe, C., Baxter, L., Forster, G., Matthews, F.E., et al. (2011). Microarray analysis of the astrocyte transcriptome in the aging brain: relationship to Alzheimer's pathology and APOE genotype. *Neurobiol. Aging 32*, 1795–1807.
- Sinha, S., Itani, F.R., and Karandikar, N.J. (2014). Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunol. Res. 59*, 254–265.

Sirko, S., von Holst, A., Wizenmann, A., Götz, M., and Faissner, A. (2007). Chondroitin sulfate glycosaminoglycans control proliferation, radial glia cell differentiation and neurogenesis in neural stem/progenitor cells. *Dev. Camb. Engl.* *134*, 2727–2738.

Sirko, S., von Holst, A., Weber, A., Wizenmann, A., Theocharidis, U., Götz, M., and Faissner, A. (2010). Chondroitin sulfates are required for fibroblast growth factor-2-dependent proliferation and maintenance in neural stem cells and for epidermal growth factor-dependent migration of their progeny. *Stem Cells Dayt. Ohio* *28*, 775–787.

Skulina, C., Schmidt, S., Dornmair, K., Babbe, H., Roers, A., Rajewsky, K., Wekerle, H., Hohlfeld, R., and Goebels, N. (2004). Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *101*, 2428–2433.

Sobel, R.A., and Ahmed, A.S. (2001). White matter extracellular matrix chondroitin sulfate/dermatan sulfate proteoglycans in multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* *60*, 1198–1207.

Sobel, R.A., Mitchell, M.E., and Fondren, G. (1990). Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in cellular immune reactions in the human central nervous system. *Am. J. Pathol.* *136*, 1309–1316.

Sofroniew, M.V. (2005). Reactive astrocytes in neural repair and protection. *Neurosci. Rev. J. Bringing Neurobiol. Neurol. Psychiatry* *11*, 400–407.

Sofroniew, M.V. (2009). Molecular dissection of reactive astrogliosis and glial scar formation. *Trends Neurosci.* *32*, 638–647.

Sofroniew, M.V., and Vinters, H.V. (2010). Astrocytes: biology and pathology. *Acta Neuropathol. (Berl.)* *119*, 7–35.

Sosa, R.A., Murphey, C., Ji, N., Cardona, A.E., and Forsthuber, T.G. (2013). The kinetics of myelin antigen uptake by myeloid cells in the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *191*, 5848–5857.

Spence, R.D., and Voskuhl, R.R. (2012). Neuroprotective effects of estrogens and androgens in CNS inflammation and neurodegeneration. *Front. Neuroendocrinol.* *33*, 105–115.

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

- Streit, W.J., Walter, S.A., and Pennell, N.A. (1999). Reactive microgliosis. *Prog. Neurobiol.* *57*, 563–581.
- Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2006). Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat. Protoc.* *1*, 1952–1960.
- Su, S.B., Silver, P.B., Zhang, M., Chan, C.C., and Caspi, R.R. (2001). Pertussis toxin inhibits induction of tissue-specific autoimmune disease by disrupting G protein-coupled signals. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *167*, 250–256.
- Sun, D., Whitaker, J.N., Huang, Z., Liu, D., Coleclough, C., Wekerle, H., and Raine, C.S. (2001). Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *166*, 7579–7587.
- Taber, K.H., and Hurley, R.A. (2008). Astroglia: not just glue. *J. Neuropsychiatry Clin. Neurosci.* *20*, iv–129.
- Takeda, K., Kaisho, T., Yoshida, N., Takeda, J., Kishimoto, T., and Akira, S. (1998). Stat3 activation is responsible for IL-6-dependent T cell proliferation through preventing apoptosis: generation and characterization of T cell-specific Stat3-deficient mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *161*, 4652–4660.
- Tanaka, K., Watase, K., Manabe, T., Yamada, K., Watanabe, M., Takahashi, K., Iwama, H., Nishikawa, T., Ichihara, N., Kikuchi, T., et al. (1997). Epilepsy and exacerbation of brain injury in mice lacking the glutamate transporter GLT-1. *Science* *276*, 1699–1702.
- Trajkovic, V., Vuckovic, O., Stosic-Grujicic, S., Miljkovic, D., Popadic, D., Markovic, M., Bumbasirevic, V., Backovic, A., Cvetkovic, I., Harhaji, L., et al. (2004). Astrocyte-induced regulatory T cells mitigate CNS autoimmunity. *Glia* *47*, 168–179.
- Traugott, U., and Lebon, P. (1988). Multiple sclerosis: involvement of interferons in lesion pathogenesis. *Ann. Neurol.* *24*, 243–251.
- Tremblay, M.-È., Stevens, B., Sierra, A., Wake, H., Bessis, A., and Nimmerjahn, A. (2011). The role of microglia in the healthy brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *31*, 16064–16069.
- Trotter, J., DeJong, L.J., and Smith, M.E. (1986). Opsonization with antimyelin antibody increases the uptake and intracellular metabolism of myelin in inflammatory macrophages. *J. Neurochem.* *47*, 779–789.
- Tzartos, J.S., Khan, G., Vossenkamper, A., Cruz-Sadaba, M., Lonardi, S., Sefia, E., Meager, A., Elia, A., Middeldorp, J.M., Clemens, M., et al. (2012). Association of innate immune activation with latent Epstein-Barr virus in active MS lesions. *Neurology* *78*, 15–23.

- Veldhoen, M., Hocking, R.J., Flavell, R.A., and Stockinger, B. (2006). Signals mediated by transforming growth factor-beta initiate autoimmune encephalomyelitis, but chronic inflammation is needed to sustain disease. *Nat. Immunol.* *7*, 1151–1156.
- Venken, K., Hellings, N., Liblau, R., and Stinissen, P. (2010). Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends Mol. Med.* *16*, 58–68.
- Vincent, V.A.M., DeVoss, J.J., Ryan, H.S., and Murphy, G.M. (2002). Analysis of neuronal gene expression with laser capture microdissection. *J. Neurosci. Res.* *69*, 578–586.
- Voskuhl, R.R., Peterson, R.S., Song, B., Ao, Y., Morales, L.B.J., Tiwari-Woodruff, S., and Sofroniew, M.V. (2009). Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *29*, 11511–11522.
- Waldner, H., Collins, M., and Kuchroo, V.K. (2004). Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J. Clin. Invest.* *113*, 990–997.
- Wang, X., Haroon, F., Karray, S., Martina Deckert, null, and Schlüter, D. (2013). Astrocytic Fas ligand expression is required to induce T-cell apoptosis and recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *Eur. J. Immunol.* *43*, 115–124.
- Weber, M.S., Prod'homme, T., Patarroyo, J.C., Molnarfi, N., Karnezis, T., Lehmann-Horn, K., Danilenko, D.M., Eastham-Anderson, J., Slavin, A.J., Linington, C., et al. (2010). B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann. Neurol.* *68*, 369–383.
- Wilhelmsson, U., Bushong, E.A., Price, D.L., Smarr, B.L., Phung, V., Terada, M., Ellisman, M.H., and Pekny, M. (2006). Redefining the concept of reactive astrocytes as cells that remain within their unique domains upon reaction to injury. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *103*, 17513–17518.
- Willenborg, D.O., Fordham, S., Bernard, C.C., Cowden, W.B., and Ramshaw, I.A. (1996). IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *157*, 3223–3227.
- Willis, S.N., Stadelmann, C., Rodig, S.J., Caron, T., Gattenloehner, S., Mallozzi, S.S., Roughan, J.E., Almendinger, S.E., Blewett, M.M., Brück, W., et al. (2009). Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain. *Brain J. Neurol.* *132*, 3318–3328.

Wolf, S.D., Dittel, B.N., Hardardottir, F., and Janeway, C.A. (1996). Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice. *J. Exp. Med.* *184*, 2271–2278.

Wucherpfennig, K.W., Catz, I., Hausmann, S., Strominger, J.L., Steinman, L., and Warren, K.G. (1997). Recognition of the immunodominant myelin basic protein peptide by autoantibodies and HLA-DR2-restricted T cell clones from multiple sclerosis patients. Identity of key contact residues in the B-cell and T-cell epitopes. *J. Clin. Invest.* *100*, 1114–1122.

Yao, Y., and Tsirka, S.E. (2011). Truncation of monocyte chemoattractant protein 1 by plasmin promotes blood-brain barrier disruption. *J. Cell Sci.* *124*, 1486–1495.

Yeh, T.-H., Lee, D.Y., Gianino, S.M., and Gutmann, D.H. (2009). Microarray analyses reveal regional astrocyte heterogeneity with implications for neurofibromatosis type 1 (NF1)-regulated glial proliferation. *Glia* *57*, 1239–1249.

York, N.R., Mendoza, J.P., Ortega, S.B., Benagh, A., Tyler, A.F., Firan, M., and Karandikar, N.J. (2010). Immune regulatory CNS-reactive CD8+T cells in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Autoimmun.* *35*, 33–44.

Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., and Barres, B.A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* *32*, 6391–6410.

Zamvil, S., Nelson, P., Trotter, J., Mitchell, D., Knobler, R., Fritz, R., and Steinman, L. (1985). T-cell clones specific for myelin basic protein induce chronic relapsing paralysis and demyelination. *Nature* *317*, 355–358.

Zang, Y.C.Q., Li, S., Rivera, V.M., Hong, J., Robinson, R.R., Breitbach, W.T., Killian, J., and Zhang, J.Z. (2004). Increased CD8+ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* *172*, 5120–5127.

Zeinstra, E., Wilczak, N., Streefland, C., and De Keyser, J. (2000). Astrocytes in chronic active multiple sclerosis plaques express MHC class II molecules. *Neuroreport* *11*, 89–91.

Zivadinov, R., Nasuelli, D., Tommasi, M.A., Serafin, M., Bratina, A., Ukmar, M., Pirko, I., Johnson, A.J., Furlan, C., Pozzi-Mucelli, R.S., et al. (2006). Positivity of cytomegalovirus antibodies predicts a better clinical and radiological outcome in multiple sclerosis patients. *Neurol. Res.* *28*, 262–269.

Thèse de Doctorat

Flora Guillot

Caractérisation de l'infiltrat lymphocytaire et de la signature moléculaire de l'astrocyte au cours de la neuroinflammation autoimmune

Defining lymphocyte infiltrate and astrocyte reactivity in an autoimmune neuroinflammation model

Résumé

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie autoimmune, démyélinisante et dégénérative du système nerveux central (SNC). La réponse T CD4 est impliquée dans le développement de la SEP et son modèle animal : l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE). De récentes données montrent que les lymphocytes T CD8 anti-myéline peuvent être impliqués d'autant plus qu'ils sont présents abondamment dans les lésions SEP. Afin de mieux comprendre la contribution des T CD8 pathogéniques, deux récents modèles ont été évalués. Le premier consiste à immuniser des souris avec un épitope de la myéline T CD8 spécifique (MOG37-46). Les souris développent une EAE modérée avec une prépondérance de T CD4 dans le SNC. La réactivation périphérique des T CD8 augmente le rapport T CD8/T CD4 dans le SNC. Le second modèle est basé sur le transfert de T CD8 anti-hémagglutinine (HA) dans des souris DKI exprimant HA par les oligodendrocytes. L'irradiation (2Gy) des souris DKI permet une infiltration lymphocytaire sans symptôme apparent. Les résultats sont discutés au vu des données récentes de la littérature. En parallèle, nous avons caractérisé la réactivité astrocytaire dans le modèle classique EAE afin de mieux définir l'implication des astrocytes dans la maladie. Pour la première fois dans ce modèle, nous avons caractérisé le profil moléculaire des astrocytes de la substance blanche isolés par microdissection laser dans les lésions spinales mettant en évidence l'expression spécifique de médiateurs proinflammatoires et d'enzymes du métabolisme stéroïdien. Ces données ouvrent de nouvelles voies pour contrer la réactivité gliale dans les maladies neuroinflammatoires comme la SEP.

Mots clés

Lymphocytes T, réactivité astrocytaire, encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), microdissection laser, moelle épinière, neuroinflammation, sclérose en plaques

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is an autoimmune, demyelinating and degenerative disease of the central nervous system (CNS), in which astrocyte reactivity is considered an important player. The CD4 T cell response is strongly associated with development of MS and its animal models such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Recent data suggest that anti-myelin CD8 T cells may be also implicated as CD8 T cells are abundant in MS lesions. To better understand the contribution of pathogenic CD8 T cells, two animal models that have been described were evaluated. The first one consists of mice immunized with a specific CD8 T cell myelin epitope (MOG37-46). Mice develop mild EAE with CD4 T overwhelming CD8 T cells in CNS. Boosting the CD8 immune response increased slightly the CD8/CD4 ratio in the CNS. The second model is based on the adoptive transfer of anti-HemAgglutinin (HA) CD8 T cells in DKI transgenic mice, which express HA by oligodendrocytes. Only irradiation (2Gy) of DKI mice allowed CNS infiltration of CD8 T cells but without apparent clinical signs. These results are discussed in light of recent literature. In parallel, we characterized the astrocyte reactivity in a classical EAE to better define the implication of astrocytes in the pathology. For this, we used for the first time in this model laser-capture microdissection to isolate white matter astrocytes in spinal cord lesion. Selected transcript profiling analysis revealed astrocytic expression of pro-inflammatory mediators and enzymes involved in oestrogen metabolism. These results give new clues for targeting glial reactivity in neuroinflammatory disorders such as MS.

Key Words

T cells, astrocytic reactivity, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), laser microdissection, spinal cord, neuroinflammation, multiple sclerosis