



# Rôle du système plexus choroïde-liquide céphalorachidien dans la distribution des cellules immunes au sein du système nerveux central, exemple de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale

Charlotte Schmitt

## ► To cite this version:

Charlotte Schmitt. Rôle du système plexus choroïde-liquide céphalorachidien dans la distribution des cellules immunes au sein du système nerveux central, exemple de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale. Neurosciences. Université Claude Bernard - Lyon I, 2012. Français. NNT: . tel-00664941

**HAL Id: tel-00664941**

**<https://theses.hal.science/tel-00664941>**

Submitted on 31 Jan 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THESE DE L'UNIVERSITE DE LYON

Délivrée par

L'UNIVERSITE CLAUDE BERNARD LYON 1

ECOLE DOCTORALE

**Neurosciences et Cognition**

DIPLOME DE DOCTORAT

soutenue publiquement le 11 janvier 2012

par

**Charlotte SCHMITT**

**Rôle du système plexus choroïde-liquide céphalorachidien dans la  
distribution des cellules immunes au sein du système nerveux central,  
exemple de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale**

Directeur de thèse :

Dr Jean-François GHERSI-EGEA

JURY :	Pr Jérôme HONNORAT	Président du jury
	Dr Bénédicte DEHOUCK	Rapporteur
	Dr Klaus PETRY	Rapporteur
	Pr Catherine LUBETZKI	Examineur
	Dr Jean-François GHERSI-EGEA	Directeur de thèse





# UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

## Président de l'Université

**M. A. Bonmartin**

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur G. Annat

Vice-président du Conseil des Etudes et de la Vie Universitaire

M. le Professeur D. Simon

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur J-F. Mornex

Secrétaire Général

M. G. Gay

## ***COMPOSANTES SANTE***

Faculté de Médecine Lyon Est – Claude Bernard

Directeur : M. le Professeur J. Etienne

Faculté de Médecine et de Maïeutique Lyon Sud – Charles Mérieux

Directeur : M. le Professeur F-N. Gilly

UFR d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. Bourgeois

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : M. le Professeur F. Locher

Institut des Sciences et Techniques de la Réadaptation

Directeur : M. le Professeur Y. Matillon

Département de formation et Centre de Recherche en Biologie Humaine

Directeur : M. le Professeur P. Farge

## ***COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE***

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. le Professeur F. De Marchi

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. Fleury

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme le Professeur H. Parrot

Département GEP

Directeur : M. N. Siauve

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. Akkouche

Département Mathématiques

Directeur : M. le Professeur A. Goldman

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. Ben Hadid

Département Physique

Directeur : Mme S. Fleck

Département Sciences de la Terre

Directeur : Mme le Professeur I. Daniel

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. C. Collignon

Observatoire de Lyon

Directeur : M. B. Guiderdoni

Ecole Polytechnique Universitaire de Lyon 1

Directeur : M. P. Fournier

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. Pignault

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. le Professeur C. Coulet

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. le Professeur J-C. Augros

Institut Universitaire de Formation des Maîtres

Directeur : M. R. Bernard



# Remerciements

Au Président du Jury,

**Monsieur Jérôme HONNORAT**. Je vous suis reconnaissante d'avoir accepté de présider ce jury et je vous remercie également de m'avoir accepté au sein de votre laboratoire.

Aux rapporteurs de ce travail,

**Madame Bénédicte DEHOUC** et **Monsieur Klaus PETRY**. Merci d'avoir accepté d'examiner ce travail et pour vos remarques et conseils judicieux. Veuillez trouver ici le témoignage de ma profonde reconnaissance.

A l'examinatrice de ce travail,

**Madame Catherine LUBETZKI**. Merci d'avoir accepté de participer à ce jury. Veuillez trouver ici l'expression de ma profonde gratitude.

A **Jean-François GHERSI-EGEA**. Merci de m'avoir fait confiance pendant ces 5 années. Merci pour toutes ces connaissances que vous m'avez fait découvrir, et qui m'ont fait apprécier ce travail. Et je vous remercie surtout de m'avoir guidé jusque là. Je remercie également **Nathalie** pour ces nombreuses aides et ses conseils.

Je dirai également merci à **Pascale**. Que de bonnes discussions scientifiques, ou non, merci pour ton implication dans la vie de ce laboratoire, les différentes animations organisées etc... Et surtout un IMMENSE merci d'avoir un jour de juillet embauché **Adeline** ! Adeline, tellement de choses faites toutes les deux ... Par où commencer ? Nos loonngguuues discussions (pas toujours scientifiques...) qui ont sûrement empêchées nos voisins de travailler ... mais bon ... Nos manips EAE, quelle belle histoire ! Nos week-end, nos sorties, nos repas, nos cafés, nos soirées filles ... et pour finir en beauté notre colloq, Merci, merci, merci pour toutes ces choses superbes partagées avec toi ! Vivement les prochaines vacances de deux amoureux et deux tourteaux !!

Un grand merci à tout le labo et bonne continuation à ONCO-FLAM.



Mon travail de thèse s'est inscrit dans le cadre d'un programme de recherche de la Fondation pour l'Aide à la Recherche sur la Sclérose En Plaques (ARSEP), qui m'a allouée une bourse de thèse. Les publications et communications issues de ces travaux ainsi que des travaux de recherches antérieurs sont listées ci-après.

### **Publications et communications relatives au travail de thèse**

**Schmitt C**, Strazielle N, Gherzi-Egea JF. *Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation and experimental autoimmune encephalomyelitis occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the midbrain.* En préparation

**Schmitt C**, Strazielle N, Gherzi-Egea JF. Early leukocyte infiltration in cisterns and velae of the brain during experimental autoimmune encephalomyelitis. **Société d'Etudes des Interfaces Sang-Cerveau, Paris**, 14 Octobre 2011 (communication orale)

**Schmitt C**, Strazielle N, Gherzi-Egea JF. Time course of immune cell distribution in choroid plexus, velae, cisterns and periventricular areas in experimental autoimmune encephalopathy models. **European ARSEP meeting, Paris**, 12-13 mai 2011 (communication affichée)

**Schmitt C**, Strazielle N, Gherzi-Egea JF. Distribution of immune cells along CSF compartments in EAE models. **13th International Symposium Signal Transduction in the Blood-Brain Barrier Symposium, Zurich**, 2-4 septembre 2010 (communication affichée)

**Schmitt C**, Strazielle N, Giraudon P, Gherzi-Egea JF. Phenotype and distribution of immune cells associated to CSF compartments, in two rodent EAE models. **France-Spain ARSEP meeting, Paris**, 3 Mai 2010 et SEISC, Paris, 31 Mai 2010 (communication affichée)

### **Publications antérieures**

**Schmitt C**, Strazielle N, Richaud P, Bouron A, Gherzi-Egea JF. *Active transport at the blood-CSF barrier contributes to manganese influx into the brain.* **J Neurochem** 2011 Mai ; 117(4):747-56

Gazzin S, Strazielle N, **Schmitt C**, Fèvre-Montange M, Ostrow JD, Tiribelli C, Gherzi-Egea JF. *Differential expression of the multidrug-resistance-related proteins ABCB1 and ABCC1 between blood-brain interfaces.* **J Comp Neurol** 2008 Oct 10 ; 510(5):497-507

Alix E, **Schmitt C**, Strazielle N, Gherzi-Egea JF. *Prostaglandin E2 metabolism in rat brain: Role of the blood-brain interfaces.* **Cereb Fluid Res** 2008 Mar 4 ; 5:5



# ABREVIATIONS

ABC : ATP-Binding Cassette  
ALCAM : Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule  
ARN : Acide RiboNucléique  
BHE : Barrière Hémato-Encéphalique  
BDNF : Brain-derived Neurotrophic Factor  
BSLCR : Barrière Sang-LCR  
CFA : Complete Freund's Adjuvant  
CMH : Complexe Majeur d'Histocompatibilité  
CPA : Cellule Présentatrice d'Antigène  
CSf : Colony-Stimulating Factor  
DA : Dark Agouti  
EAE : Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale  
ICAM : InterCellular Adhesion Molecule  
IFA : Incomplete Freund's Adjuvant  
IFN : Interferon  
IL : Interleukine  
IRM : Imagerie par Résonance Magnétique  
ITGB5 : Intégrine beta5  
ITGB6 : Intégrine beta6  
JAM : Junction Adhesion Molecule  
LCR : Liquide CéphaloRachidien  
LFA-1 : Lymphocyte Function associated Antigen 1  
MAG : Myelin Associated Glycoprotein  
MBP : Myelin Basic Protein  
MMP : Matrix MettalloProtease  
MOG : Myelin Olygodendrocyte Glycoprotein  
MRP : Multidrug Resistance associated Protein  
NK : Natural Killer  
NT-3 : Neurotrophine-3  
OAT : Organic Anion Transporters



OCT : Organic Cation Transporters  
OCV : Organes CircumVentriculaires  
PAMPS : Pathogen-Associated Molecular Patterns  
PSGL1 : P-selectin Glycoprotein Ligand 1  
SEP : Sclérose En Plaque  
SJL/J : Swiss/Jackson Laboratory  
SLC : Solute Carrier  
SNC : Système Nerveux Central  
TCR : T-cell-receptor  
TGF : Transforming Growth Factor  
Th : Lymphocyte T helper  
TLR : Toll-like receptor  
TNF : Tumor Necrosis Factor  
Treg : Lymphocyte T régulateur  
VCAM : Vascular Cell Adhesion Molecule  
VI : Velum Interpositum  
VLA-4 : Very Late Antigen 4

# SOMMAIRE

## ABREVIATIONS

## SOMMAIRE

## RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

<b>I - La Sclérose En Plaques et ses modèles expérimentaux</b>	<b>1</b>
I.1 - La Sclérose En Plaques	1
I.1.1 - L'épidémiologie	1
I.1.2 - La clinique	1
I.1.3 - Les corrélats anatomiques	3
I.1.4 - Les hypothèses physiopathologiques	4
I.1.4 a - L'auto-immunité	5
I.1.4 b - L'action virale centrale	6
I.2 - Les modèles animaux de la Sclérose En Plaques	7
I.2.1 - Les trois principaux modèles	7
I.2.2 - L'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale	7
I.2.2 a - L'espèce et la souche	8
I.2.2 b - L'antigène	11
I.2.2 c - Le mode d'induction	12
<b>II - Les acteurs immunitaires dans l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale</b>	<b>15</b>
II.1 - Les cellules circulantes du système immunitaire	15
II.1.1 - Les cellules de la réponse innée	15
II.1.2 - Les cellules de la réponse adaptative	18
II.2 - Implication des différentes cellules immunes dans la physiopathogénèse de l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale	20
II.2.1 - La réponse immune innée	20
II.2.2 - La réponse immune adaptative	22
<b>III - Accès des cellules immunes au système nerveux central</b>	<b>29</b>
III.1 - Les différents compartiments cérébraux	29
III.1.1 - Le parenchyme	29
III.1.2 - Les méninges	30
III.1.3 - Le liquide céphalorachidien et les compartiments liquidiens du cerveau	32
III.1.3 a - Le système ventriculaire	32

III.1.3 b - Les compartiments extraventriculaires	33
III.1.3 c - La production et la circulation du LCR	35
III.1.3 d - Les rôles du liquide céphalorachidien	37
III.2 - Les barrières sang-cerveau	38
III.2.1 - La barrière hémato-encéphalique	39
III.2.1 a - Le support anatomique	39
III.2.1 b - La barrière physique	41
III.2.1 c - La barrière métabolique	42
III.2.2 - La barrière sang-liquide céphalorachidien	43
III.2.2 a - La structure anatomique	43
III.2.2 b - La barrière physique	45
III.2.2 c - La barrière métabolique	45
III.2.3 - Les organes circumventriculaires	46
III.3 - L'interaction particulière entre le système immunitaire et le SNC	46
III.3.1 - L'immunoprivilège du système nerveux central	47
III.3.2 - La surveillance neuro-immunitaire	49
III.3.3 - Voies d'infiltration des cellules immunes dans le SNC au cours de l'EAE	51
III.3.3 a - Le mécanisme classique	51
III.3.3 b - Les passages alternatifs	53
III.3.3 c - Les mécanismes de migration établis pour les autres types de leucocytes	56
<b>OBJECTIFS GENERAUX</b>	<b>2</b>
<b>RESULTATS</b>	<b>63</b>
<b>Influence des compartiments liquidiens dans l'infiltration cérébrale des leucocytes au cours de l'inflammation périphérique et de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale</b>	<b>65</b>
<b>Partenaires moléculaires engagés dans la migration de cellules immunes au travers de la barrière sang-liquide céphalorachidien</b>	<b>97</b>
<b>Capacité des plexus choroïdes à sécréter des molécules immuno-actives</b>	<b>107</b>
<b>DISCUSSION GENERALE</b>	<b>117</b>
<b>CONCLUSIONS &amp; PERSPECTIVES</b>	<b>133</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE</b>	<b>137</b>

# **RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES**



## **I - LA SCLEROSE EN PLAQUES ET SES MODELES EXPERIMENTAUX**

### **I.1 - La Sclérose En Plaques**

#### **I.1.1 - L'épidémiologie**

La Sclérose en Plaques (SEP) est une maladie inflammatoire démyélinisante et neurodégénérative du système nerveux central (SNC), première cause de handicap neurologique de l'adulte jeune dans les pays occidentaux où elle affecte environ 1 personne sur 1000. En France, l'incidence est d'environ 2500 nouveaux cas par an. Dans le monde, la prévalence de la maladie est cependant très variable géographiquement avec un gradient de distribution nord-sud, la prévalence étant plus importante dans les régions les plus éloignées de l'équateur. La SEP débute le plus souvent chez l'adulte jeune, entre 20 et 40 ans et touche plus fréquemment la femme (sexe ratio 2/1).

Bien que la maladie ait été décrite dès le 19<sup>ième</sup> siècle par Jean Martin Charcot (1868), à ce jour l'étiologie précise de la SEP reste inconnue. Elle est très probablement multifactorielle, conséquence de l'interaction de facteurs génétiques et environnementaux.

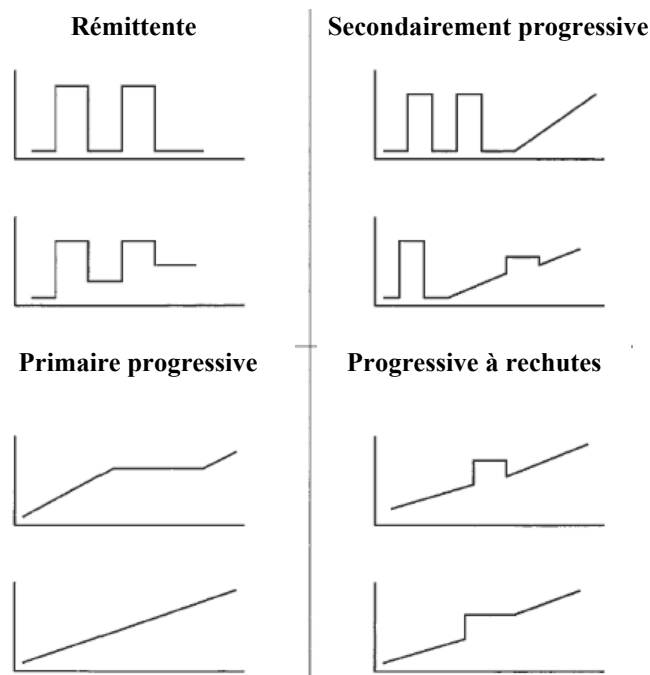
#### **I.1.2 - La clinique**

La SEP est décrite comme une maladie de la substance blanche du SNC. Elle se traduit cliniquement par des épisodes de troubles neurologiques focaux touchant les nerfs optiques, l'encéphale ou la moelle épinière.

Le diagnostic de la SEP ne peut être porté qu'après au moins deux épisodes cliniques distincts et qu'en présence de lésions disséminées à la fois dans le temps et dans l'espace (Keegan and Noseworthy, 2002).

L'évolution de la SEP est marquée par des poussées ou par la progression d'un handicap. Une poussée est définie par la survenue de nouveaux signes ou symptômes neurologiques, ou par l'aggravation de signes ou symptômes préexistants, durant au moins 24h. La progression se caractérise par une aggravation continue d'un handicap neurologique pendant au moins 6 mois.

On distingue quatre formes principales de sclérose en plaques, selon la façon dont la maladie évolue dans le temps (Figure 1).



**Figure 1 : Différents profils d'évolution de la SEP.**

*D'après (Hemmer et al., 2002; Kieseier and Hartung, 2003)*

Représentation de la symptomatologie en fonction du temps

\* La forme **rémittente**. Dans 85 % à 90 % des cas, la maladie débute par la forme rémittente (aussi appelée « cyclique rémittente »), caractérisée par des poussées, avec ou sans séquelles, entrecoupées par des phases de rémission où il n'y a pas de progression du handicap. Dans la majorité des cas, au bout de plusieurs années, cette forme de la maladie peut évoluer vers une forme secondairement progressive.

\* La forme **primaire progressive** (ou progressive d'emblée). Cette forme se caractérise par une évolution lente et constante de la maladie, dès le diagnostic. Elle concerne 10 % des cas. Contrairement à la forme rémittente, il n'y a pas de véritable poussée, bien que la maladie puisse s'aggraver par moments. Cette forme apparaît généralement plus tard dans la vie, vers l'âge de 40 ans.

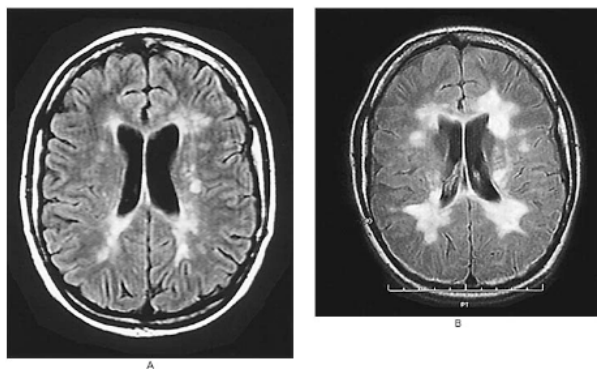
\* La forme **progressive à rechute**. Une forme rare qui se présente initialement comme une forme primaire progressive, mais au cours de cette maladie les individus développent des exacerbations neurologiques.

\* La forme **secondairement progressive**. Après une forme rémittente initiale, la maladie peut s'aggraver de façon continue. Des poussées peuvent survenir, mais elles ne sont pas suivies de rémissions franches et le handicap s'aggrave peu à peu. La plupart des personnes souffrant de la forme rémittente présenteront une forme progressive dans les 15 ans qui suivent le diagnostic de la maladie.

### I.1.3 - Les corrélats anatomiques

Sur le plan anatomopathologique, la SEP se distingue d'autres atteintes neuro-inflammatoires du SNC par la présence de **plaques inflammatoires et de démyélinisation**. Elles consistent en une zone hypocellulaire bien délimitée caractérisée par la perte de myéline, la conservation relative des axones, et la formation de cicatrices astrocytaires. Ces lésions sont de taille variable, de quelques millimètres à plusieurs centimètres. A l'origine, les plaques ont été définies comme étant des atteintes de la substance blanche, mais selon les profils évolutifs de la maladie, les lésions observées diffèrent.

Les altérations structurales et immunologiques peuvent définir des **lésions focales**, classiquement visibles par Imagerie à Résonance Magnétique (IRM), qui sont souvent dans des régions périventriculaires (Figure 2). Ces lésions présentent un nombre important de macrophages contenant des produits de dégradations de la myéline. Ces lésions actives sont les plus observées au cours des formes rémittentes.

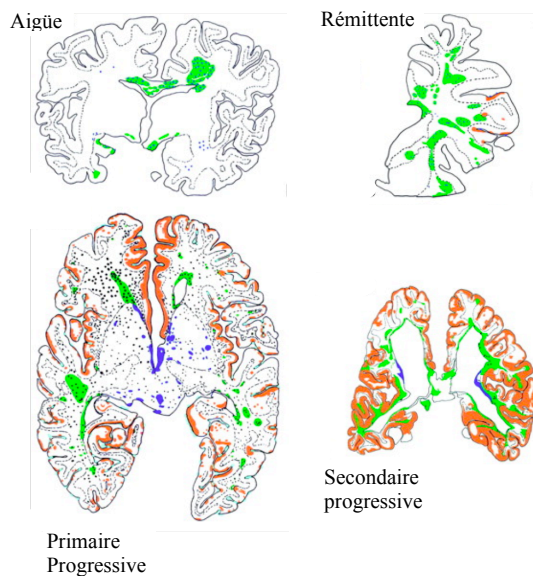


**Figure 2 : Signal obtenu par IRM FLAIR réalisé chez un patient souffrant d'une forme rémittente de SEP.** Les plaques sont localisées préférentiellement autour des ventricules.

*D'après (Noseworthy et al., 2000)*

Dans les formes progressives de la maladie, ces lésions actives sont rares et des **lésions d'expansions lentes** sont observées. Elles diffèrent des lésions actives par une absence de macrophages et une faible quantité de lymphocytes T uniquement périvasculaires, souvent une veinule au centre de la plaque. Au contraire, ces lésions présentent en bordure une microglie activée et une démyélinisation active. D'autres **lésions de type corticales** sont présentes dans les deux formes progressives (Figure 3). Elles apparaissent comme de petites lésions périvasculaires intracorticales ou en continuité des plaques de la matière blanche sous-corticale. La forme de démyélinisation corticale la plus abondante est la démyélinisation sous-piale. Cette lésion est composée essentiellement de lymphocytes B et T avec une importante activation de la microglie. Enfin, bien que d'apparence normale en IRM, la matière blanche présente autour des lésions correspond à des zones de **lésions diffuses**. Dans ces lésions, les





**Figure 3 : Schéma de répartition des différents types de plaques selon les formes de la SEP.** Vert : plaque focales démyélinisantes dans la matière blanche ; rouge : démyélinisation corticale ; bleu : lésions démyélinisantes dans la matière grise profonde.

*D'après (Kutzelnigg et al., 2005)*

infiltrats sont présents au niveau périvasculaire mais également de façon disséminée dans le tissu. Ils sont composés de lymphocytes T, majoritairement de type CD8<sup>+</sup>. Cette inflammation est associée à une activation microgliale importante, elle-même associée à des altérations et des pertes axonales diffuses. Ces lésions ne sont visibles que par IRM spectroscopique (Lassmann et al., 2007).

La démyélinisation est la désintégration de la myéline phagocytée par les macrophages. Ceci perturbe la conduction nerveuse, expliquant les signes cliniques. La gaine de myéline est considérée comme le site privilégié du processus lésionnel, mais une mort oligodendrocytaire, une prolifération astrocytaire, ainsi qu'une atteinte axonale précoce ont également été observées. Il faut noter que la SEP a longtemps été considérée comme une pathologie uniquement démyélinisante avec une relative épargne axonale. Cependant, des études ont montré que des lésions axonales aiguës sont fréquentes au sein de plaques actives et aboutissent à un appauvrissement des prolongements neuronaux au sein des plaques chroniques (cicatrice gliale) (Trapp et al., 1999). Une remyélinisation s'ensuit, qui est plus ou moins complète et accompagnée d'une gliose astrocytaire réactionnelle.

#### I.1.4 - Les hypothèses physiopathologiques

L'initiation des processus physiopathologiques est inconnue. Néanmoins, de nombreux arguments sont en faveur d'une participation du système immunitaire et plus particulièrement d'une activation périphérique des lymphocytes T. Il existe actuellement deux

principales hypothèses pour expliquer cette activation lymphocytaire : l'auto-immunité et l'action virale centrale.

#### I.1.4 a - L'auto-immunité

Cette hypothèse est actuellement privilégiée. En effet, des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> autoréactifs dirigés contre des antigènes myéliniques et présentant un phénotype activé ou mémoire sont retrouvés dans le sang des patients atteints de SEP. Ces lymphocytes présentent un profil de sécrétion cytokinique particulier et expriment spécifiquement un ensemble de récepteurs aux chimiokines. Ceci suggère l'implication des lymphocytes T autoréactifs, dirigés contre des antigènes de la myéline, dans l'initiation de la maladie. Cependant, il est actuellement bien établi que des lymphocytes T autoréactifs sont des éléments constitutifs du système immunitaire normal. Et dans ce cas, c'est leur activation et non leur présence qui est à l'origine de l'effet délétère. L'origine de cette activation reste inconnue, plusieurs mécanismes sont possibles :

- \* Une activation par **mimétisme moléculaire** : l'activation des lymphocytes T requiert l'interaction de leur TCR (T-cell-receptor) avec l'antigène spécifique associé aux molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH), exprimées à la surface des cellules présentatrices d'antigène (CPA). Des expériences de substitutions d'acides aminés du peptide MBP (Myelin Basic Protein), auto-antigène potentiellement impliqué dans la SEP, ont mis en évidence la capacité d'un TCR à répondre malgré tout à divers ligands afin d'induire une réponse immune large (Vergelli et al., 1996). Des lymphocytes T autoréactifs reconnaissant des antigènes viraux ou bactériens, présentant des homologies avec les antigènes du soi, peuvent donc induire des réponses auto-immunes. Ainsi il pourrait exister une relation possible entre infection et SEP. Cependant, l'agent pathogène responsable d'un tel mimétisme reste inconnu, suggérant ainsi que plusieurs pathogènes pourraient agir dans des contextes génétiques variés pour déclencher la SEP.

- \* Une activation par des **super-antigènes**. Ce sont des protéines produites par les bactéries ou les virus et qui ont la capacité de se lier directement au TCR sans être apprêté par une CPA. Lors d'une telle interaction, les lymphocytes T activés sécrètent des quantités plus importantes de cytokines que lors d'une activation classique. Dans certains modèles animaux, ces super-antigènes semblent capables d'initier le développement d'une encéphalomyélite chez des animaux immunisés par des antigènes de la myéline (Torres et al., 2001).

- \* Un défaut des **lymphocytes T régulateurs (Treg)**. Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> appartenant à cette sous-population expriment le marqueur CD25 à leur surface et sont anergiques. Ils

présentent des effets supprimeurs sur les lymphocytes T  $CD4^+CD25^-$  (Randolph and Fathman, 2006). Leur implication dans le développement de la maladie a été mise en avant par diverses expériences qui ont montrées un taux élevé de Treg chez des animaux résistants à la maladie, et cette résistance est levée après traitement à l'aide d'anticorps anti-CD25 (Reddy et al., 2004). Chez l'homme, des travaux ont montré une altération fonctionnelle de ces lymphocytes régulateurs chez les patients atteints de SEP (Haas et al., 2005).

\* Un défaut d'expression des **molécules de co-stimulation**. Ces molécules, CD80/CD86, CD28, sont nécessaires à l'activation du TCR au moment de la reconnaissance de l'antigène par un lymphocyte T naïf. Elles vont être responsables du niveau d'activation des lymphocytes T. Après activation, les lymphocytes prolifèrent, ce qui induit un mécanisme de régulation négative. Cependant, une altération des signaux de co-stimulation au sein des lymphocytes autoréactifs peut induire une maladie auto-immune. Des lymphocytes T  $CD4^+$  autoréactifs n'exprimant pas le CD28, et par conséquent n'ayant pas de régulation négative, ont été identifiés chez des patients atteints de SEP (Markovic-Plese et al., 2001).

\* Une activation des CPA par les **récepteurs 'Toll-like' (TLR)**. Au cours d'une infection, les CPA reconnaissent l'antigène via leur TLR ce qui les active. Une étude a montré que l'absence de CPA activées retardait l'initiation d'une maladie auto-immune. Ainsi, l'activation préalable des CPA par un agent infectieux, serait un élément déterminant dans la balance entre tolérance et maladie auto-immune (Waldner et al., 2004).

#### I.1.4 b - L'action virale centrale

L'association infection virale et SEP est discutée depuis de nombreuses années. Elle suggère que lors d'une infection virale du SNC, des lymphocytes T, activés en périphérie, vont migrer jusqu'au tissu cible. Ces lymphocytes vont alors éliminer les cellules infectées et par un effet bystanders, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires peut provoquer la mort des cellules environnantes. Cette destruction des cellules nerveuses peut alors secondairement conduire à un processus auto-immun. Cette hypothèse s'appuie uniquement sur le modèle animal de SEP induit par le virus de Theiler (Miller et al., 2001), puisqu'à ce jour, aucun virus particulier n'a été identifié au sein du parenchyme nerveux des patients atteints de SEP.

L'étiologie de la SEP demeure méconnue, notamment l'identité précise de l'antigène myélinique responsable. Reposant sur les deux hypothèses d'initiation des processus physiopathologiques, auto-immune et virale, de nombreux modèles animaux sont utilisés pour

tenter d'élucider la pathogénèse de la SEP et pour tester des approches pharmacologiques pour le traitement de la SEP.

## **I.2 - Les modèles animaux de la Sclérose En Plaques**

### **I.2.1 - Les trois principaux modèles**

Trois principaux modèles animaux sont utilisés pour étudier les mécanismes immunologiques impliqués dans la physiopathologie de la SEP :

- \* **les modèles transgéniques** donc spontanés : il s'agit de souris double mutantes, pour le gène RAG-1 (recombination activating gene) nécessaire à la spécialisation du TCR et pour les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  du TCR, qui ont un répertoire formé uniquement de lymphocytes T spécifiques de la protéine de la myéline (Goverman et al., 1993; Olivares-Villagómez et al., 1998). Ces souris sont paralysées dans les 60 jours suivant leur naissance.

- \* **l'Encéphalomyélite induite par le virus de Theiler** (Welsh et al., 2009) qui se traduit par le développement d'une démyélinisation progressive médiée par des lymphocytes T-CD4<sup>+</sup> sécrétant des cytokines pro-inflammatoires qui favorisent la destruction de la myéline par les macrophages (Miller et al., 2001).

- \* **l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE)** (Lassmann, 2007), décrite plus en détail ci-dessous.

### **I.2.2 - L' Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale**

L'EAE est la maladie inflammatoire du système nerveux central la plus couramment utilisée comme modèle d'étude de la SEP. L'EAE est induite par la stimulation d'une réponse immune dirigée contre un antigène du système nerveux central.

La principale caractéristique de ce modèle est une activation périphérique de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> spécifiques d'un antigène de la myéline. Ces lymphocytes T encéphalitogènes induisent une inflammation cérébrale caractérisée par des infiltrats de lymphocytes, un recrutement de macrophages et une activation de la microglie. Les lésions sont causées par une action synergique des lymphocytes T entraînant l'inflammation, et d'une production d'anticorps par les lymphocytes B provoquant des démyélinisations de la substance blanche (Lassmann, 2007).

Étant donné les variations considérables des signes cliniques et de l'évolution de la maladie parmi les patients atteints de SEP, il n'existe pas un seul modèle qui représente toutes les

facettes de la SEP. Par contre, la variété des modèles animaux existants reflète les différents aspects cliniques et pathologiques de la SEP (Wekerle, 2008).

Les modèles d'EAE diffèrent par l'espèce animale ainsi que la souche utilisée, par l'auto-antigène utilisé, et par le mode d'induction. Ces différents paramètres sont analysés plus en détails ci-après.

### I.2.2 a - L'espèce et la souche

L'EAE a été induite chez le mouton, le chien, le lapin, le cochon d'inde, le hamster mais elle est plus régulièrement induite chez le macaque et le marmouset, le rat et la souris (Baxter, 2007). L'utilisation de primates non-humains présente de nombreux avantages comme les similarités génétiques, immunologiques et neuro-anatomiques entre le singe et l'homme ou la non-consanguinité impliquant un degré de complexité qui existe chez l'homme, et qui permettent de diminuer l'écart existant entre les modèles classiques murins et la maladie humaine. Ceci est un avantage pour la validation des essais de nouvelles thérapies. Les primates non-humains étant susceptibles et exposés aux pathogènes infectieux de façon similaire à l'homme, cela peut faciliter la compréhension des facteurs génétiques et environnementaux liés à la sclérose en plaques. D'autre part, des outils adaptés à l'homme comme l'IRM peuvent être utilisés chez le primate, ce qui n'est pas le cas chez les rongeurs où les éventuelles plaques ne sont pas détectées par IRM en raison d'une quantité de matière blanche trop faible. En revanche, le coût de la mise en place de ces modèles est très élevé et des difficultés éthiques sont rencontrées ('t Hart and Massacesi, 2009; Brok et al., 2001). L'induction de l'EAE chez les rongeurs est donc bien plus utilisée en recherche plus fondamentale pour l'analyse physiopathologique de la maladie, notamment chez le rat et la souris. L'utilisation d'animaux consanguins a été particulièrement utile à l'identification des épitopes des antigènes responsables de l'induction de l'EAE.

Pendant longtemps, le rat a été un modèle d'EAE très utilisé en raison d'une incidence d'encéphalomyélite élevée avec une évolution clinique reproductible et rapide, contrairement aux modèles murins pour lesquels l'incidence était faible et l'évolution plus hétérogène que chez le rat (Swanborg, 1995; Swanborg, 2001). Il est classiquement admis que contrairement à l'homme, l'inflammation chez le rat est localisée préférentiellement au niveau de la moelle épinière (Schneider et al., 2009) et l'EAE est plutôt de type monophasique.

Puis les modèles murins ont été améliorés par l'utilisation de la toxine *pertussis* (voir mode d'induction ci-dessous), rendant les souris plus susceptibles à l'EAE (Gold et al., 2006). La

souris est maintenant très largement utilisée, notamment en raison des possibilités d'expérimentation par transgénèse et des outils d'analyses moléculaires existants. Ces modèles présentent plutôt une forme d'EAE avec rechutes/remissions semblable à la pathologie humaine. Au niveau histopathologique, chez le rat comme chez la souris, des infiltrats de cellules immunes sont observés dans le cerveau mais la démyélinisation est plus marquée chez la souris. En général, le système nerveux chez la souris est plus endommagé que celui du rat avec une démyélinisation s'accompagnant de dommages tissulaires aux niveaux axonal et neuronal (Gold et al., 2006; Swanborg, 1995).

La susceptibilité à l'EAE au sein d'une espèce dépend également de la souche considérée, puisqu'une part significative est attribuée au « terrain génétique ». Certaines souches sont dites 'résistantes' lorsqu'aucune encéphalomyélite ne se développe quelque soit l'antigène spécifique de la myéline utilisé. D'autres souches sont dites 'susceptibles' lorsqu'au moins un antigène permet d'induire une encéphalomyélite.

Chez le rat, les souches Sprague-Dawley et Albino Oxford sont résistantes, alors que les souches Brown Norway, Lewis et Dark Agouti (DA) sont susceptibles. Des différences au sein de ces souches peuvent également être dépendantes des gènes du CMH. Par exemple un rat Lewis d'haplotype 'n' a plus de démyélinisation, qu'un rat Lewis d'haplotype 'a'. Inversement, l'altération du nerf optique est dépendante de gènes autres que le CMH, puisque les rats Brown Norway ont une atteinte optique mais pas les rats Lewis, alors que les deux souches ont les gènes du CMH identiques (Storch et al., 1998). Concernant l'évolution de l'EAE, les deux souches Lewis et DA offrent l'avantage d'une évolution temporaire prévisible ainsi qu'une susceptibilité uniforme pour de faible dose de MBP. Un inconvénient majeur de l'EAE chez le rat Lewis est l'évolution monophasique de la maladie - une seule crise suivie d'une rémission - avec une démyélinisation rare ou absente. Ce n'est pas le cas chez le rat DA, où l'induction de l'EAE avec de la moelle épinière favorise le développement d'une maladie à rechutes et démyélinisante (Lorentzen et al., 1995). Ceci pourrait être expliqué par un profil cytokinique différent en réponse à l'antigène. La présentation d'un antigène à un lymphocyte T auxiliaire (ou T helper) entraîne la différenciation de ce dernier, soit en Th1 (T helper de type 1), soit en Th2 (T helper de type 2). Ceci a pour conséquence la sécrétion de cytokines, soit pro-inflammatoires stimulant l'immunité cellulaire, soit anti-inflammatoires stimulant la production d'anticorps, respectivement. Chez le rat DA, le profil cytokinique développé suite à l'induction est de type Th1 alors que chez le rat Lewis, le profil est de type Th2 (Di Marco et al., 2001). Une autre différence observée entre les souches

Lewis et DA est le développement d'une tolérance immunologique chez le rat Lewis lors d'une seconde induction d'EAE alors que chez le rat DA, une seconde induction exacerbe la maladie (Swanborg, 1995).

Chez la souris, différentes souches peuvent être utilisées pour induire une EAE parmi lesquelles les souris Swiss/Jackson Laboratory (SJL/J), PL/J, C57BL/6, BIOZZI ABH et NOD/Lt. Tout comme chez le rat les différentes souches de souris répondent différemment à l'EAE. Par exemple la souche SJL/J présente une forme d'EAE à rechutes/remissions alors que les souris C57BL6 développent plutôt une maladie chronique, c'est-à-dire initiée par une crise suivie d'un handicap qui persiste dans le temps (Brown and Sawchenko, 2007; Mangano et al., 2010).

Deux souris, les SJL/J et A.SW, avec un haplotype identique du CMH (H-2s) mais un phénotype de lymphocyte Th différent, développent des profils cliniques différents : une EAE à rechutes pour les premières et une EAE progressive, c'est-à-dire sans remissions, pour les secondes. Les deux phénotypes Th1 et Th2 sont nécessaires au développement de la maladie, mais l'évolution de la maladie est définie par le phénotype Th prévalent. Les souris SJL/J ont un faible phénotype Th2 donc une faible réponse immune humorale (faible production d'anticorps) alors que les souris A.SW sont plutôt de phénotype Th2 que Th1. Une réponse humorale est souvent associée à une forme progressive de la maladie. Un même antigène peut induire des profils cliniques différents chez des souris d'une même souche, mais dont le phénotype de la réponse T varie (Tsunoda et al., 2000).

Enfin, les souris SJL/J et PL/J ne sont pas résistantes à une nouvelle induction d'EAE, permettant ainsi d'obtenir une EAE chronique à rechutes/remissions (Swanborg, 1995).

D'autres paramètres peuvent également influencer le développement de l'EAE, tels que l'âge et le sexe des animaux. Chez le rat DA, une forte incidence de la neuromyéélite optique est observée chez les femelles alors que chez les mâles les nerfs optiques ne sont pas impliqués (Storch et al., 1998). Chez les souris SJL/J, les femelles développent plus de lésions cérébrales et l'incidence de la maladie est plus forte que pour les mâles. Cette différence semble dépendante de l'âge, puisque chez les jeunes souris (4-8 semaines), les mâles sont moins susceptibles à l'EAE que les femelles alors que chez les souris de 12 semaines ou plus, les mâles ont une susceptibilité équivalente à celle des femelles (Spach et al., 2009). Les hormones (œstrogènes) sont à l'origine de cette différence. Elles agiraient par un mécanisme inconnu sur les capacités de sécrétion des CPA en favorisant la sécrétion d'interleukine-12,

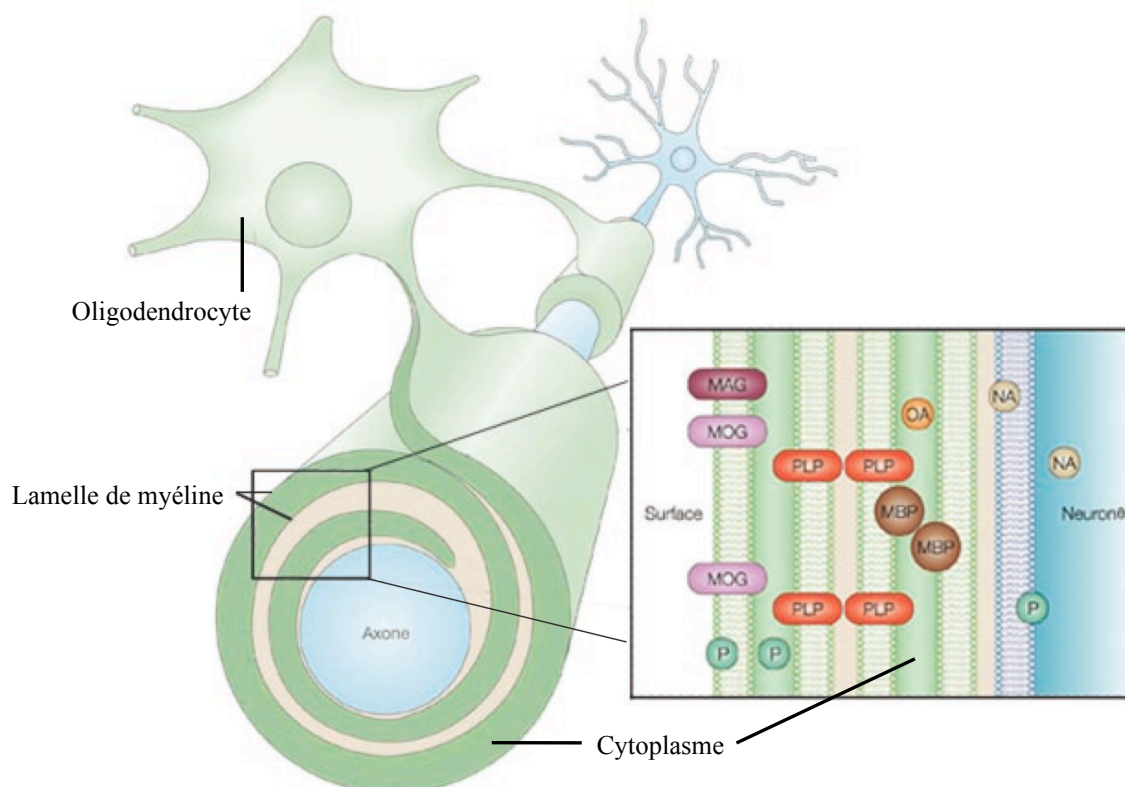


(IL-12, pro-inflammatoire) chez les femelles et d'IL-10 (anti-inflammatoire) chez les mâles (Wilcoxon et al., 2000).

### I.2.2 b -L'antigène

L'induction de l'EAE peut être réalisée en utilisant comme antigène de l'homogénat total de tissu cérébral, en général de moelle épinière, de la myéline complète, des protéines telles que la protéine basique de la myéline (MBP), la protéine protéo-lipidique (PLP), la glycoprotéine associée à la myéline (MAG) et la glycoprotéine oligodendrocytaire myélinique (MOG) ou des fractions peptidiques de ces protéines (Figure 4). Des antigènes gliaux (S-100beta) (Wekerle et al., 1994) et neuronaux (beta-Synucleine) (Kela-Madar et al., 2009) sont également utilisés.

La MBP représente 30% de la myéline totale et est très conservée entre différentes espèces mais des modifications structurales influencent l'activité encéphalitogénique de la molécule. Chez le rat Lewis, la MBP de cochon d'inde est plus active que les MBP humaine et bovine, en raison de la présence de deux acides-aminés supplémentaires dans la séquence de ces



**Figure 4 : La myéline et ses peptides antigéniques.** *Modifié de (Sherman and Brophy, 2005)*



dernières. Les peptides synthétiques correspondants à la MBP de cochon d'inde sont aussi actifs que la protéine naturelle (Swanborg, 1995). Les souris PL/J répondent à la séquence N-terminale de la molécule (Zamvil et al., 1987) alors que les souris SJL/J répondent à la séquence C-terminale de la molécule (Sakai et al., 1988).

La PLP constitue 50% de la myéline. Une séquence peptidique (43-64) est active pour les souris PL/J alors que 3 séquences (104-117 ; 139-151 ; 178-191) induisent une EAE chez les souris SJL/J. Chez le rat LW une région de la PLP (270-240) est encéphalitogénique uniquement si la séquence est N-acétylée (Swanborg, 1995).

Il y a de plus en plus d'évidences qui suggèrent que ce ne sont pas les constituants majeurs de la myéline comme MBP et PLP mais plutôt le constituant minoritaire, la MOG qui joue un rôle dans l'auto-immunité du SNC. En effet, l'EAE induite par la MOG chez les rats est plus représentative de la SEP (Gold et al., 2000). La MOG est directement accessible pour une réponse immune humorale, car elle est située sur la surface externe des oligodendrocytes. Le potentiel immunogène est important, puisque une induction d'EAE par de l'homogénat total génère des taux détectables d'anticorps anti-MOG responsables de démyélinisation. Une injection de peptide MOG35-55 induit une EAE avec démyélinisation chez les souris C57BL/6 et NOD/Lt mais les signes cliniques sont différents. Les souris NOD/Lt sont paralysées 12 à 14 jours après l'induction, avec une sévérité et une durée variables selon les souris. Les souris récupèrent complètement ou partiellement de cette première crise et d'autres crises peuvent apparaître mais toujours avec des sévérités variables. Les souris C57BL/6 développent une maladie chronique, sans rechutes (Bernard et al., 1997).

### I.2.2 c -Le mode d'induction

Il existe différents types d'induction d'EAE :

**L'EAE active** correspond à une immunisation d'un animal par un auto-antigène en présence d'adjuvant. L'antigène choisi est émulsionné avec un adjuvant avant d'être injecté chez l'animal. Ceci provoque une paralysie de la queue suivie d'une paralysie des pattes arrières puis du train arrière. En parallèle, on observe une diminution du poids de l'animal, dû à une anorexie.

Cette méthode est la plus simple et rapide à mettre en œuvre et induit une pathophysiologie reproductible (Krishnamoorthy and Wekerle, 2009).

**L'EAE passive** consiste en un transfert chez un animal naïf, de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> de type Th1, lesquels sécrètent de l'IFN $\gamma$  (Interferon) et du TNF $\alpha$  (Tumor Necrosis Factor) provenant d'un animal souffrant d'une EAE active. Une restimulation *in vitro* des lymphocytes T est

nécessaire avant le transfert. Cependant, cette restimulation et le transfert d'un grand nombre d'effecteurs activés peuvent biaiser la réponse inflammatoire (Krishnamoorthy and Wekerle, 2009).

Différents protocoles d'induction de l'EAE ont été développés et l'utilisation d'adjuvant de Freund complet (CFA) ou incomplet (IFA), respectivement avec ou sans *Mycobacterium tuberculosis*, ainsi que de la toxine *pertussis* améliorent dans certain cas l'incidence et la sévérité de la maladie. Dans certains protocoles, l'utilisation de CFA permet une injection unique d'antigène au lieu de plusieurs (Swanborg, 1995). Les effets connus de la toxine *pertussis* sur le système immunitaire sont la mitogénèse des lymphocytes T, l'augmentation de la production des cytokines et des anticorps et l'hypersensibilité retardée. Dans le cadre de l'EAE, diverses hypothèses sont mises en avant. Les mécanismes par lesquels la toxine facilite l'induction de l'EAE ont souvent été attribués à une fragilisation de la barrière hémato-encéphalique, BHE. La toxine *pertussis* pourrait agir sur l'intégrité de la barrière en dissociant temporairement les membranes intracellulaires notamment du Golgi, par action sur les ADP-ribosylation des protéines G $\alpha$ , impliquées dans la biogénèse des jonctions serrées (Kügler et al., 2007). Une interprétation alternative a été mise en avant quant aux mécanismes de la toxine *pertussis* favorisant l'apparition de l'encéphalomyélite. La toxine peut favoriser la réponse immune de type Th1 et Th2 en augmentant la prolifération des lymphocytes T et leur sécrétion d'IL-2 et IFN- $\gamma$ , IL-5 et IL-4. Ce n'est pas le cas des autres adjuvants tels que le CFA qui induit une réponse de type Th1 ou l'IFA qui induit une réponse de type Th2 (Hofstetter et al., 2002; Ryan et al., 1998). Au niveau des tissus lymphoïdes, la toxine serait captée par les CPA, ce qui entraînerait l'augmentation d'expression des molécules de costimulation à leur surface (Denkinger et al., 2007). Un troisième mécanisme est proposé par Kerfoot et collaborateurs qui montrent que la toxine induit des signaux intracellulaires via TLR4 (Toll-like receptor 4). Cela résulte en l'induction des gènes de cytokines pro-inflammatoires et du gène de la P-sélectine. Ceci aboutirait à une augmentation de l'adhésion des lymphocytes sur l'endothélium surexprimant la P-sélectine sous l'action de la toxine (Kerfoot et al., 2004) et ce au niveau des vaisseaux méningés. Récemment une équipe a étudié l'action de la toxine au niveau des capillaires cérébraux et propose également une action indirecte de la toxine sur l'endothélium. La toxine agirait via l'IL-6 pour augmenter l'expression d'ICAM-1 (Intercellular Adhesion Molecule) afin de recruter des leucocytes à la surface de l'endothélium (Richard et al., 2011).

Les doses des différents facteurs nécessaires à l'induction de l'EAE sont très variables d'un protocole à l'autre, allant de 50 à 300 µg d'antigène émulsifié dans de l'adjuvant de Freund supplémenté de 0 à 2000 µg de *Mycobacterium tuberculosis*. Les sites d'injections varient également. Les solutions antigéniques sont injectées par voie sous-cutanée ou intradermique au niveau des flancs, des coussinets des pattes ou à la base de la queue de l'animal. La toxine *pertussis*, plus particulièrement utilisée chez la souris, est injectée par voie intrapéritonéale ou intraveineuse à des doses allant de 200 à 500 ng par animal. La sévérité de la maladie et les déficits (avec ou sans rechutes) sont dépendants de la dose d'antigène, de la souche de l'animal utilisée et du mode d'immunisation. Par exemple, chez une même souche de souris C57BL/6, deux protocoles permettent d'obtenir deux évolutions de l'EAE : une EAE avec remissions et rechutes, en utilisant des faibles doses de MOG (Myelin Olygodendrocyte Glycoprotein, 50 µg), de *Mycobacterium tuberculosis* (50 µg) et de toxine (200 ng), ou alors une EAE chronique lorsque des plus fortes doses (300 µg de MOG, 400 µg de *Mycobacterium tuberculosis* et 300 ng de toxine *pertussis*) sont utilisées (Berard et al., 2010). Par contre une étude récente a analysé l'effet de différentes doses (75 à 200 µg) de *Mycobacterium tuberculosis* et de PLP sur l'évolution de l'EAE chez des souris SJL/J, et les résultats obtenus concernant l'incidence, les scores cliniques, l'évolution temporelle étaient identiques malgré les différentes doses utilisées (deLuca et al., 2010). Chez le rat DA, une EAE sévère, prolongée et à rechutes peut être induite par plusieurs combinaisons de ces différentes variables : homogénat de moelle épinière de rat ou de cobaye, IFA ou CFA, injection dans les pattes ou à la base de la queue (Lorentzen et al., 1995).

Les différents paramètres discutés ci-dessus déterminent le profil évolutif de l'EAE. Leurs différentes combinaisons peuvent aboutir à une EAE de type aigüe, chronique ou chronique à rechutes. Le choix de ces paramètres permet donc de définir le modèle approprié pour une étude donnée. Les différents profils cliniques sont le résultat de l'action relative des différents effecteurs immunitaires. C'est pourquoi nous avons choisi d'exposer, ci-après les principales actions connues des différents types de cellules immunes au cours de l'EAE.

## II - LES ACTEURS IMMUNITAIRES DANS L'ENCEPHALOMYELITIS AUTO-IMMUNE EXPERIMENTALE

### II.1 - Les cellules circulantes du système immunitaire

Les leucocytes véhiculés par le sang regroupent les granulocytes ou polynucléaires (les neutrophiles, les éosinophiles et les basophiles), les lymphocytes (les lymphocytes B, les lymphocytes T et les cellules Natural Killer, NK) et les cellules de la lignée myéloïde (les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques). Ces cellules participent soit à la réponse immune innée dont la mise en place est rapide, spontanée et sans nécessité de contact préalable avec l'antigène étranger, soit à la réponse immune adaptative qui est plus lente à mettre en place, spécifique d'un antigène donné, repose sur l'action coordonnée de différents types de cellules et qui engendre une mémoire immunologique assurant une protection durable (Figure 5).

#### II.1.1 - Les cellules de la réponse innée

Les **neutrophiles** sont les leucocytes les plus abondants dans le sang chez l'homme. Ils représentent 60-70% des leucocytes du sang. Ce sont les premières cellules à être recrutées aux sites d'infection. Ils défendent l'organisme contre les infections bactériennes ou fongiques. Les neutrophiles phagocytent les microbes qui sont alors détruits par l'action de dérivés réactifs de l'oxygène et de composants toxiques contenus dans les granules des neutrophiles, telle que la myéloperoxydase (Arnhold and Flemmig, 2010). Dans un contexte physiologique, le maintien de l'homéostasie du système immunitaire est régulé par l'apoptose constitutive ou spontanée des neutrophiles, par exemple suite à une phagocytose. Puis les macrophages phagocytent les neutrophiles engagés dans ce processus (Kennedy and DeLeo, 2009).

Les **éosinophiles** ont un rôle dans la défense contre les parasites en libérant dans le milieu extracellulaire ou après fusion avec le parasite, des molécules cytotoxiques telles que des protéines cationiques. Dans le cas de réactions allergiques, telle que l'asthme, les éosinophiles libèrent également des substances qui favorisent la dégranulation des mastocytes et des basophiles (Shamri et al., 2011). Les éosinophiles peuvent agir comme cellules présentatrices










d'antigène et exprimer des molécules de costimulations dans des conditions d'activation. Ils peuvent présenter des antigènes solubles à des lymphocytes T  $CD4^+$ , ils sécrètent également des cytokines favorisant la prolifération des lymphocytes T et leur polarisation vers un phénotype Th1 ou Th2 (Blanchard and Rothenberg, 2009).

Les **basophiles** s'accumulent principalement au site de la réaction allergique. Ils sont rapidement activés par l'allergène et amplifient la réaction inflammatoire locale en libérant l'histamine contenue dans leurs granules. Les basophiles expriment le récepteur de haute affinité à l'immunoglobuline E. La formation d'un complexe immunoglobuline E et son récepteur entraîne des signaux de transduction résultant en la décharge de nombreux médiateurs allergiques tels que les eicosanoïdes (Sullivan and Locksley, 2009; Wedemeyer et al., 2000).

Les **cellules NK** proviennent de la lignée lymphocytaire. Il existe deux sous-types de cellules NK agissant lors d'infections virales, bactériennes ou parasitaires, les cytotoxiques et les non-cytotoxiques sécrétant des cytokines, telle que l'IFN- $\gamma$ . Deux mécanismes de cytotoxicité existent : le dépôt de granules lytiques (perforine, granzymes A et B) au sein des cellules cibles (Müllbacher et al., 1999), et l'expression du récepteur de mort à la surface de la cellule cible activée par le TNF (tumor necrosis factor) produit par les cellules NK (Zamai et al., 1998). Les cellules NK sécrétant de l'IFN- $\gamma$  peuvent agir dans la réponse adaptative en favorisant l'orientation des lymphocytes T naïfs vers un phénotype Th1, interagir avec les cellules dendritiques afin de réguler leur maturation et ainsi limiter la présentation de l'antigène aux cellules effectrices et donc limiter la réponse immunitaire (Winkler-Pickett et al., 2008).

Les **monocytes** et les **macrophages** sont des cellules ayant essentiellement une fonction de phagocytose. Les monocytes sont des cellules du sang, et les macrophages et les cellules dendritiques sont issus de la transformation des monocytes après le passage de ceux-ci dans les tissus. Les monocytes ont une activité de phagocytose, sécrètent des cytokines comme l'IL-1 et le CSf (colony-stimulating factor) et ont une activité myéloperoxydase. Le nombre de monocytes augmente rapidement dans le sang lors d'infection ou d'inflammation (Robbins and Swirski, 2010). Les monocytes circulent pendant plusieurs jours dans le sang avant d'entrer dans les tissus pour renouveler les macrophages tissulaires résidents (Gordon and

Taylor, 2005). La morphologie des monocytes matures dans la circulation sanguine est hétérogène. Ils constituent chez l'homme entre 5 et 10 % des leucocytes.

IMMUNITE INNEE							IMMUNITE ADAPTATIVE		
									
Basophile	Neutrophile	Eosinophile	Monocyte / Macrophage	Cellule NK	Cellule dendritique	Lymphocyte T CD8+	Lymphocyte T CD4+	Lymphocyte B	
% des leucocytes sanguins									
Homme	0 à 1	50 à 80	1 à 4	5 à 10				20 à 40	
Rat	0 à 1	10 à 20	0 à 1	1 à 2				80 à 90	
Contexte d'intervention									
Allergie	Bactérie Champignon	Parasite	Parasite	Virus Bactérie	Virus Tumeur	Cible multiple	Virus Tumeur	Bactérie Grefe Hypersensibilité retardée	Cible multiple Hypersensibilité immédiate
Principaux modes d'action									
Ecosanoïdes	Granules lytiques	Molécules cytotoxiques	Cytokines	Phagocytose	Perforine	Présentation antigénique	Granules lytiques	Cytokines	Présentation antigénique
Histamine	Dérivés réactifs oxygène			Oxide nitrique	Granzyme		Récepteur mort	Coopération lymphocyte B	Production d'anticorps

**Figure 5 : Les principaux types cellulaires intervenant dans la réponse immune innée et/ou adaptative.** Les différents types cellulaires sont classiquement associés soit à l'immunité innée, soit à l'immunité adaptative mais leurs actions sont multiples et de nombreuses interactions existent entre ces deux modes de réponse immune.

Les **macrophages** font partis de l'immunité innée (élimination de pathogènes). Les macrophages sont considérés activés 'classiquement' (M1) lorsqu'ils sont stimulés par l'IFN- $\gamma$  ou du lipopolysaccharide et sécrètent alors de l'oxide nitrique important pour éliminer les pathogènes intracellulaires. Les macrophages M1 agissent par endocytose des bactéries et virus, et synthétisent de réactifs oxygénés. Les macrophages sont considérés activés 'alternativement' (M2) lorsqu'ils sont stimulés par l'IL-4 ou l'IL-13 et qu'ils sécrètent de l'IL-10, du TGF- $\beta$  (Transforming Growth Factor) et de l'arginase-1 nécessaire à l'élimination de parasites extracellulaires. Les macrophages M2 sont également associés aux réponses de type Th2 et à la réparation tissulaire. Ils agissent avec les neutrophiles pour phagocyter les débris, et sont source de chimio-attractant, de facteurs de croissance (TGF- $\beta$  et TNF- $\alpha$ ) et de

facteurs profibrotiques tels que la fibronectine, l'IL-1 $\beta$  et les métalloprotéases. Ces facteurs sont nécessaires au recrutement des cellules endothéliales indispensables à l'angiogénèse, et aux fibroblastes indispensables à la reconstruction de la matrice extracellulaire (Mutsaers et al., 1997).

### II.1.2 - Les cellules de la réponse adaptative

Les **cellules dendritiques** sont présentes dans de nombreux organes, où elles ont un rôle de 'sentinelles'. Lorsqu'une cellule dendritique rencontre un antigène, celui-ci est phagocyté. La cellule dendritique migre alors dans les ganglions lymphatiques régionaux où elle active les cellules de l'immunité adaptative, les lymphocytes T. Contrairement aux autres CPA (lymphocytes B et macrophages), les cellules dendritiques sont définies comme les CPA 'professionnelles' car elles expriment constitutivement les récepteurs de membranes permettant l'activation des lymphocytes T ou B naïfs (Banchereau et al., 2000; Coquerelle and Moser, 2010).

Les **lymphocytes B** sont traditionnellement impliqués dans l'immunité humorale et les maladies auto-immunes par leur différenciation en cellules plasmiques sécrétant des anticorps (DiLillo et al., 2010; Schmidlin et al., 2009). Les lymphocytes B sont également comptés parmi les CPA car elles peuvent présenter un antigène aux lymphocytes T CD4<sup>+</sup> auxiliaires et favoriser leur différenciation. Pour cela l'interaction entre lymphocytes B et T implique des molécules de costimulation telles que B7/CD28, CD40/CD40L présentes respectivement à la surface des cellules B et T (Evans et al., 2000). Les lymphocytes B peuvent également être des régulateurs négatifs de la réponse inflammatoire, en sécrétant de l'IL-10, ce qui inhibe la prolifération des lymphocytes T. Un autre mécanisme de régulation négative peut être engendré par les lymphocytes B en favorisant l'expansion des Treg supprimant ainsi l'inflammation (Blair et al., 2009).

Les **lymphocytes T** se présentent principalement sous trois types :

- les **T cytotoxiques** (CD8<sup>+</sup>) sont les cellules effectrices essentielles de l'immunité à médiation cellulaire. Ils ont une action cytotoxique vis-à-vis des cellules infectées par un virus ou des cellules cancéreuses. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> naïfs initient leur prolifération et différenciation suite à la présentation d'un complexe peptide antigénique/CMHI par une cellule présentatrice d'antigène. Ils acquièrent des fonctions effectrices telles que le changement d'expression des molécules d'adhésion et des récepteurs de chimiokines à leur

surface (Arens and Schoenberger, 2010). Les mécanismes cytotoxiques dirigés contre les cellules infectées sont l'induction d'une cytolysse médiée par dégranulation ou l'engagement dans la voie d'apoptose. Dans certaines infections par les *Listeria*, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> sécrètent également des cytokines telles que le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$  qui favorisent indirectement une induction du phénotype Th1 des lymphocytes T auxiliaires (voir ci-dessous) en activant les macrophages, ceci conduit à l'augmentation de l'expression des molécules du CMHI et II à leur surface (Berg et al., 2002). Après une infection, 90% des lymphocytes T CD8<sup>+</sup> meurent par apoptose et les cellules restantes forment une population de lymphocytes T mémoires (Rutishauser and Kaech, 2010).

- les **T auxiliaires** (CD4<sup>+</sup>) sont des cellules auxiliaires ou helper (Th) et se divisent en sous-groupes (Th1, Th2, Th17...) selon les cytokines qu'ils produisent. Les Th1 sécrètent préférentiellement de l'IFN- $\gamma$  et de la lymphotoxine qui permettent l'activation des macrophages au site de l'inflammation. Ces cellules Th1 sont importantes pour la défense contre les pathogènes intracellulaires. Les lymphocytes Th1 sont générés à partir de Th naïfs activés par l'IFN- $\gamma$  sécrété par des CPA, puis différenciés en lymphocytes Th1 exprimant les récepteurs à l'IL-12. Les lymphocytes Th2 sont décrits comme ayant différentes fonctions. Ils sécrètent préférentiellement de l'IL-4, de l'IL-6 et de l'IL-10, et privilégient la prolifération et la différenciation des lymphocytes B, essentiels pour l'élimination d'organismes extracellulaires comme les parasites. Ils ont pour origine un lymphocyte T helper naïf activé par la présentation d'un antigène au niveau de son TCR et par la présence d'IL4 dans le milieu extracellulaire (Jäger and Kuchroo, 2010). Récemment, les lymphocytes Th17 ont été décrits. Ils produisent principalement de l'IL-17A de l'IL-17F qui ont des propriétés pro-inflammatoires. L'IL-17 agit sur des types cellulaires divers pour induire la production d'autres cytokines, chimiokines, métalloprotéases (Bettelli et al., 2007).

- les **T-régulateurs** sont indispensables pour le maintien de la tolérance immunologique et l'homéostasie immune. Les Treg sont des lymphocytes T CD4<sup>+</sup> et expriment le marqueur CD25, ils suppriment l'activation, la prolifération et les fonctions effectrices de nombreuses cellules immunes, telles que les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, lymphocytes T CD8<sup>+</sup>, cellules NK, lymphocytes B. Cette capacité de contrôle de la réponse immune par le Treg met en avant leur rôle central dans la prévention des maladies auto-immunes, les allergies et dans les mécanismes de tolérance aux greffes (Rouse, 2007; Sakaguchi et al., 2010).

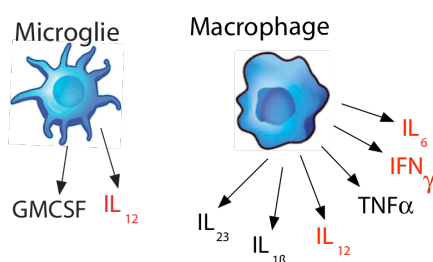


## II.2 - Implication des différentes cellules immunes dans la physiopathogénèse de l'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale

Les différentes interactions cellulaires établies au cours de l'EAE sont présentées ci-dessous, et les principales actions cytokiniques sont résumées dans la Figure 6.

### II.2.1 - La réponse immune innée

Les **macrophages** issus des monocytes du sang et la microglie, considérée comme les cellules



résidentes dans le SNC, sont responsables de plusieurs fonctions dans l'EAE. Chez les rats DA lors de la phase d'induction, l'expansion clonale des lymphocytes T n'a pas encore eu lieu, les macrophages CD68<sup>+</sup> sont les premières cellules infiltrantes détectées dans la moelle épinière et la microglie ne semble pas être activée. Ces

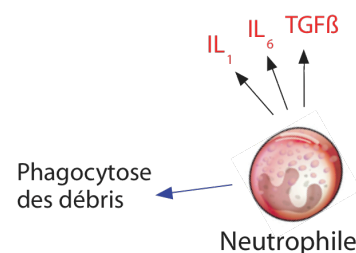
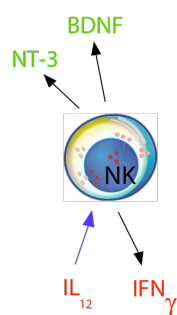
cellules peuvent être présentatrices d'antigènes pour les lymphocytes T (Mensah-Brown et al., 2011). En effet, les macrophages retrouvés dans l'EAE surexpriment des molécules de costimulation telle que B7.1 et diminuent l'expression de B7.2 qui aurait un rôle protecteur. De plus, une étude montre que le blocage des fonctions des macrophages pendant la phase d'induction limite l'infiltration des cellules autoréactives et donc le développement de la maladie. Au cours de l'EAE, les molécules du CMH II sont surexprimées à la surface des macrophages et de la microglie, ce qui pour cette dernière favoriserait la rémission clinique en activant les populations de Treg (Almolda et al., 2010), alors que pour les macrophages, ceci participerait à l'activation des populations T helper (Hickey and Kimura, 1988). Les macrophages et la microglie peuvent sécréter en abondance des molécules effectrices, telles que des cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$ , GM-CSF, IL-12, IL-23). Les macrophages et la microglie sont également importants dans l'attraction des leucocytes au niveau du SNC inflammé. Par exemple, CCL3, CCL2 sont sécrétés par les macrophages et leurs récepteurs sont surexprimés à la surface des leucocytes (Batoulis et al., 2010).

Les **mastocytes**, classiquement identifiés aux cours des allergies dus à leur capacité de dégranulation, semblent également participer à l'induction de l'EAE. En effet, la localisation des sites d'inflammation correspond aux sites d'accumulation des mastocytes dans le SNC et le pourcentage de mastocytes dégranulés dans le SNC est corrélé avec le début des signes cliniques au cours d'une EAE aiguë (Brenner et al., 1994). Les mastocytes possèdent à leur

surface les récepteurs FcγRIIB/III, et les récepteurs aux immunoglobulines G1 et G2b, ces dernières étant produites au cours de l'EAE induite par la MOG. Ceci suggère que ces anticorps auraient un rôle dans l'activation des mastocytes. Une fois activés, les mastocytes peuvent sécréter des médiateurs pouvant influencer l'induction et la progression de la maladie à plusieurs niveaux. Par exemple, la libération d'amines vasoactives faciliterait l'altération de la BHE et favoriserait une entrée de leucocytes au sein du SNC. La sécrétion de cytokines tel que le TNF-α pourrait réguler l'expression de molécules d'adhésion au niveau de l'endothélium, et dégrader des composants de la myéline (Secor et al., 2000).

Les **cellules NK** sont principalement protectrices au cours de l'EAE. En effet, une déplétion des cellules NK résulte en une exacerbation de l'EAE, due à leurs effets cytotoxiques envers les lymphocytes T autoréactifs. Les cellules NK sont capables de lyser les cellules dendritiques et cette lyse est augmentée lorsque les animaux EAE sont traités avec de l'acétate de glatiramer, une molécule utilisée dans le traitement de la SEP. De plus, ces cellules produisent du BDNF (Brain-derived neurotrophic factor) et de la neurotrophine-3 (NT-3) qui contribuent à la neuroprotection. Mais une étude a montré que les cellules NK peuvent à l'inverse être pathogènes puisqu'une déplétion des cellules NK chez une souris avant l'immunisation entraîne une diminution de la sévérité de l'EAE. Cela s'expliquerait par une diminution du nombre de lymphocytes T infiltrants et par conséquent une diminution d'expression d'IFN-γ et TNF-α (Batoulis et al., 2010; Winkler-Pickett et al., 2008).

Chez les souris classiquement sensibles à l'EAE, peu de **polynucléaires neutrophiles** sont retrouvés dans les infiltrats. Chez les souris BALB/C, considérées génétiquement résistantes à l'EAE, les infiltrats sont principalement constitués de polynucléaires neutrophiles. Les neutrophiles infiltrant sécrètent du CCL3 ce qui amplifierait les signaux d'adhésion et de migration (Nygårdas et al., 2000) facilitant l'influx de nouvelles cellules immunes. Une autre étude a montré qu'une déplétion de polynucléaires neutrophiles chez des souris SJL/J inhibe le développement de l'EAE qu'elle soit induite par transfert adoptif ou par immunisation active. Elle montre que les polynucléaires neutrophiles sont indispensables pendant la phase effectrice de l'EAE et non dans la phase de sensibilisation (McColl et al., 1998). Chez le rat, lors d'une EAE classique les neutrophiles sont rares, mais



peuvent occasionnellement être nombreux. Il existe cependant un modèle d'EAE chez le rat qualifié d'hyperaigüe, où de nombreux neutrophiles infiltrer les espaces périvasculaires. Ce modèle nécessite l'utilisation de la toxine *pertussis* (Levine, 1974).

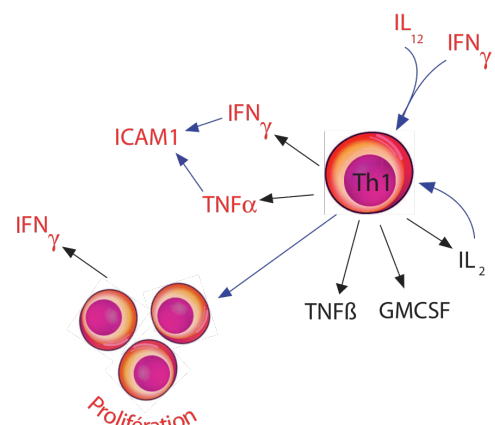
Les **cellules dendritiques** sont des CPA indispensables à l'activation des lymphocytes T. Les cellules dendritiques présentes au niveau des méninges sont cruciales pour la réactivation des lymphocytes T  $CD4^+$  lors du transfert adoptif mais également pour les inductions passives de l'EAE.

## II.2.2 - La réponse immune adaptative

Dans les modèles d'EAE, les lymphocytes T doivent être activés en périphérie avant d'être réactivés dans les espaces sous-arachnoïdiens par des cellules présentatrices d'antigènes de type CMH II. Les lymphocytes T  $CD4^+$  spécifiques de la myéline, plutôt que les lymphocytes T  $CD8^+$ , sont les médiateurs primaires de l'inflammation car les protocoles d'induction utilisés favorisent l'activation des lymphocytes T par des molécules du CMH II. De nombreuses évidences montrent l'importance des lymphocytes Th1 dans l'initiation de la maladie. Premièrement, les inflammations observées dans les lésions de l'EAE sont similaires à celles retrouvées au cours des réactions allergiques définies comme étant médiée par des Th1. Deuxièmement, des études immunohistologiques ont révélé la présence d'IL-2, de TNF et d'IFN- $\gamma$ , typiquement sécrétées par les Th1 mais pas d'IL-4 dans les tissus du SNC au pic de la maladie (Merrill et al., 1992). Au contraire les ARN (acide ribonucléique) de l'IFN- $\gamma$  et les taux de cette protéine sont quasiment indétectables lorsque les animaux sont en phase de rémission, alors que l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- $\beta$ , sécrétées typiquement par les Th2, dominent durant cette phase. Troisièmement, des expériences de transfert adoptif démontrent que les cellules Th1 sont suffisantes pour induire l'EAE.

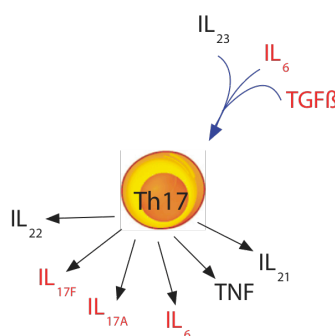
En effet, des clones cellulaires Th1 spécifiques de la MBP ou de la PLP peuvent induire une inflammation, alors que des clones Th2 spécifiques de ces mêmes peptides ne le peuvent pas (Liblau et al., 1995).

Les **lymphocytes Th1** ( $CD4^+$ ) semblent être les premiers effecteurs utilisant l'IL-12 pour leur différenciation, ce qui induit la sécrétion par la



suite d'IFN- $\gamma$ , d'IL-2 et de TNF. Issazadeh et al (Issazadeh et al., 1996) ont montré une augmentation des taux d'ARN de l'IL-12 et du TNF- $\beta$  dans la moelle épinière des rats DA 3-4 jours avant l'apparition des premiers signes cliniques neurologiques, et des taux augmentés d'ARN de l'IFN- $\gamma$  augmentent au cours des premiers signes cliniques et au pic de la maladie. L'apparition précoce de l'IL-12 à la fois dans les organes lymphoïdes et fortement dans le SNC au cours de l'EAE peut être liée à la réponse immune médiée par des cellules de type Th1. Ainsi, l'IL-12 est un facteur obligatoire pour la formation des lymphocytes Th1 et est également requis pour une prolifération optimale des clones Th1 et non Th2. Cette stimulation favorise ainsi la production d'IFN- $\gamma$ , qui induit par la suite l'expression des molécules du CMH I et CMH II à la surface des CPA, des molécules impliquées dans la régionalisation des infiltrats de lymphocytes T, et la production d'autres cytokines comme l'IL-1 $\beta$  et le TNF- $\alpha$  (Batoulis et al., 2010). Ceci suggère un rôle pathogène pour l'IFN- $\gamma$ .

Malgré d'importantes évidences concernant le rôle des lymphocytes Th1 dans la pathogénèse de l'EAE, le paradigme des CD4/Th1 est remis en cause. La controverse concerne l'importance du rôle de l'IL-12. En effet, comme expliqué ci-dessus, de nombreuses études montrent que l'IL-12 participe à la pathogénicité de l'EAE. Mais d'autres études montrent que des souris déficientes pour la sous-unité p35 de l'IL-12 développent une EAE normale alors que les souris déficientes pour la sous-unité p40 rend les souris résistantes à l'EAE. Ceci suggère que d'autres cytokines possédant également la sous-unité p40 puissent avoir un rôle important dans le développement de l'EAE. L'IL-23 est composée de la sous-unité p40 mais cette cytokine a des modes d'actions différents de l'IL-12. Elle favorise le développement d'une sous-population de **lymphocytes T, les Th17**, qui produisent de l'IL-17, IL-17F, du



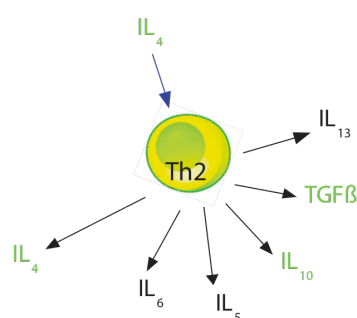
TNF et de l'IL-6 (Thakker et al., 2007). Un rôle émergent des Th17 a donc récemment été mis en évidence dans la pathogénicité de l'EAE. En effet, des souris déficientes en IL-17 développent une EAE moins sévère, et la neutralisation de l'IL-17 par des anticorps rend les souris moins susceptibles à l'EAE (Hofstetter et al., 2005; Komiyama et al., 2006). De plus, la différenciation des Th17 est induite par l'IL-6 et le TGF- $\beta$  et

est altérée par l'IL-12 et l'IFN- $\gamma$ , et les Th17 expriment le récepteur aux chemokines CCR6 à leur surface. Une étude a récemment montré que les souris déficientes en CCR6 ne développent pas d'EAE malgré une réponse immune de type Th17 engagée. Ceci

s'expliquerait par un défaut dans le mécanisme d'extravasation puisque l'injection des cellules Th17-CCR6<sup>+</sup> à des souris déficientes en CCR6 redeviennent susceptibles (Reboldi et al., 2009). Ces observations suggèrent que les cellules Th1 et Th17 peuvent être impliquées dans le développement de la maladie à différents moments et via différents compartiments cérébraux.

L'orientation des lymphocytes T vers un profil Th1 ou Th17 a un rôle dans la distribution spatiale (cerveau ou moelle épinière) des autres effecteurs immunitaires. Le transfert adoptif de lymphocytes T spécifiques de la MOG orienté soit Th1 soit Th17 induit une EAE présentant des infiltrats respectivement au niveau de la moelle épinière et au niveau du cerveau. Cette différence pourrait être expliquée par une différence d'expression du récepteur Rb de l'IFN- $\gamma$  qui est plus importante au niveau du cerveau. Un nombre plus important de lymphocytes Th1 favorise l'augmentation du taux d'IFN- $\gamma$ . Celui-ci se lie aux récepteurs des cellules résidentes du cerveau et induit des signaux limitant la migration des cellules immunes. La proportion de cellules Th1 ou Th17 influence la répartition des sites d'inflammation. Lors de la présence d'infiltrat dans le cerveau, les taux d'IL-17 sont 25 fois plus élevés dans le cerveau que dans la moelle épinière. La neutralisation de l'IL-17 au cours de l'induction de l'EAE limite les infiltrats présents dans le cerveau. Lorsque les Th17 sont plus nombreux que les Th1, les Th17 recrutent des neutrophiles dans le SNC et augmentent la quantité de métalloprotéase-3 qui peut potentiellement activer métalloprotéase-8 et métalloprotéase-9 dans les granules des neutrophiles. Ceci induirait une fragilité de la barrière hémato-encéphalique et par conséquent permettrait l'entrée dans le SNC d'un grand nombre de cellules (Stromnes et al., 2008).

Les lymphocytes T CD4<sup>+</sup> naïfs ont également la possibilité de se différencier en Th2 dans un milieu cytokinique principalement composé d'IL-4. Les **lymphocytes Th2** sont considérés



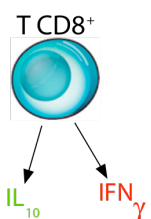
comme immunosuppresseurs. Les effets suppresseurs sont accordés car l'IL-4, l'IL-10 et le TGF- $\beta$  sont retrouvés au cours des phases de remissions de l'EAE (Khoury et al., 1992). Ces lymphocytes produisent de l'IL-4, IL-5, IL-6, IL-13 et également de l'IL-10. Chen *et al.* montrent que suite à une induction de la tolérance pour la MBP, les clones isolés de ces animaux induits produisent des cytokines de type 2.

L'injection de ces clones Th2 chez des animaux immunisés contre la MBP, les protègent du

développement de l'EAE et diminuent la maladie en cas d'injection tardive (Chen et al., 1994). De même, l'injection de Th2 spécifiques de la PLP prévient l'induction de l'EAE et limite le développement de la maladie (Kuchroo et al., 1995). Ces différentes données mettent en avant la fonction régulatrice des lymphocytes Th2.

Une action similaire est accordée aux **lymphocytes Treg**. En effet, Chen *et al.* (Chen et al., 2008) ont montré que les Treg, connus pour diminuer le développement de l'EAE, produisent un profil cytokinique de type 2, c'est-à-dire avec majoritairement de l'IL-4, du TGF- $\beta$  et de l'IL-10. Tout comme pour les Th2, une injection des Treg (CD25<sup>+</sup>) trois jours après une immunisation par le peptide de la MOG<sub>35-55</sub> confère une protection à la souris (Kohm et al., 2002). Le cotransfert de Th1 spécifiques de la MOG et de Treg chez une souris résulte en un nombre de cellules productrices d'IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  similaire à un transfert unique. Par contre, un nombre significatif de lymphocytes T spécifiques de la MOG, dont le profil cytokinique est de type 2 est également retrouvé au pic de la maladie. Les infiltrations de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> diminuent, suggérant un rôle protecteur au Treg par des mécanismes de sécrétion de cytokines anti-inflammatoires et d'inhibition de l'inflammation du SNC (Bynoe et al., 2007).

Il existe également de nombreuses études mettant en avant un potentiel rôle pathogène des **lymphocytes T CD8<sup>+</sup>** spécifiques de la myéline. Le transfert adoptif de lymphocytes T CD8<sup>+</sup>

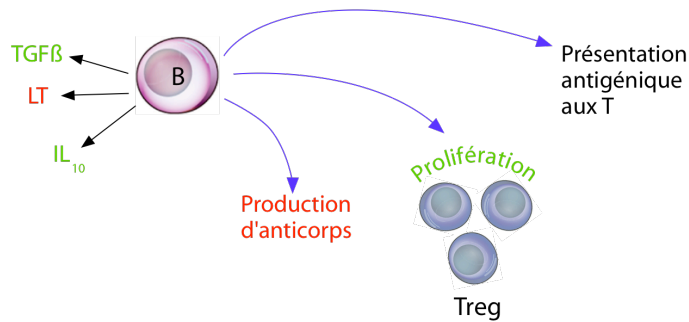


est très pathogène. Par exemple, la vaccination médiée par un virus, favorisant la réponse CD8, induit une EAE sévère reproduisant certaines caractéristiques de la SEP non obtenues lors d'une immunisation par des lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, telles que des ataxies, des altérations des neurones moteurs supérieurs, de la spasticité et moins fréquemment des paralysies. Ce type d'induction induit une maladie rapide, sévère, et létale pour toutes les souris au 14<sup>ième</sup> jour après induction. Dans ce cas, l'IFN- $\gamma$  produit par les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> aurait un rôle délétère puisque sa neutralisation permet de limiter la destruction tissulaire. En effet, l'IFN- $\gamma$  pourrait favoriser la démyélinisation en activant les macrophages et la microglie ou en ayant un effet délétère sur les oligodendrocytes (Huseby et al., 2001).

Au cours des EAE actives, les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> semblent avoir un double rôle. En effet, les souris déficientes en CD8 montrent une mortalité initiale réduite mais une augmentation des rechutes, suggérant que ces lymphocytes T CD8<sup>+</sup> pourraient soutenir la rémission de la maladie. Les lymphocytes T CD8<sup>+</sup> peuvent avoir un rôle de régulateur puisqu'ils peuvent reconnaître un peptide sur la chaîne Vb8.2 d'un TCR autoréactif à la surface d'un lymphocyte T CD4<sup>+</sup> pathogène, induisant ainsi son apoptose. La présence de ces régulateurs a été montré

mais leurs fréquences d'action et leurs mécanismes n'ont pas encore été explorés (Jiang et al., 1998; Mars et al., 2011).

En ce qui concerne les **lymphocytes B**, ils sont typiquement activés par des protéines de la myéline, et sécrètent des anticorps particulièrement pathogènes lorsque les épitopes cibles sont larges et complexes, et moins pathogènes pour des épitopes courts et linéaires (ex



MOG<sub>35-55</sub>) souvent utilisés dans les modèles EAE. Dans l'EAE, les lymphocytes B ont deux rôles possibles : la production d'anticorps et la présentation d'antigène aux lymphocytes T.

Plusieurs arguments sont en faveur du premier de ces deux rôles. Des souris déficientes en lymphocytes B sont résistantes à l'EAE induite par le polypeptide de 120 acides-aminés représentant la partie extracellulaire de la MOG mais ces souris ne sont pas résistantes à une EAE induite par le peptide MOG<sub>35-55</sub> (Lyons et al., 2002). Morris-Downes *et al.*, ont montré les effets pathogènes des anticorps anti-myéline chez les souris ABH et C57BL/6. En effet, une injection d'anticorps anti-MOG au début de la maladie exacerbe les signes cliniques et induit la formation de zones de démyélinisation dans le SNC. De plus, le taux d'anticorps anti-MOG est élevé au cours de la phase de rechute lors d'une EAE classique chez une souris ABH. Les anticorps anti-MOG semblent donc être importants dans la pathologie de l'EAE mais d'autres anticorps dirigés contre les galactocérebrosides, ou la MAG (Myelin Associates Glycoprotein) ont également des effets sur le recrutement de cellules mononucléées (Morris-Downes et al., 2002).

Des rats, traités dès la naissance par des anticorps anti-IgM pour dépléter les lymphocytes B, sont résistants à l'EAE. Mais ils redeviennent susceptibles à l'EAE lorsqu'ils reçoivent au moment de l'induction, du sérum d'autres rats immunisés (El Behi et al., 2005).

Par ailleurs, l'EAE est accélérée et exacerbée lorsqu'il y a surexpression d'auto-anticorps chez des souris transgéniques. Enfin, en plus des ciblage des protéines de la myéline, certains anticorps sont dirigés contre les lipides de la myéline comme les galactocérebrosides, ce qui aboutit à des degrés de démyélinisation plus important (Batoulis et al., 2010).

La variabilité dans la pathogénicité des anticorps contre la myéline est comparable à l'hétérogénéité de réponse liée aux types de lymphocytes T responsables de l'induction de l'EAE (Morris-Downes et al., 2002).

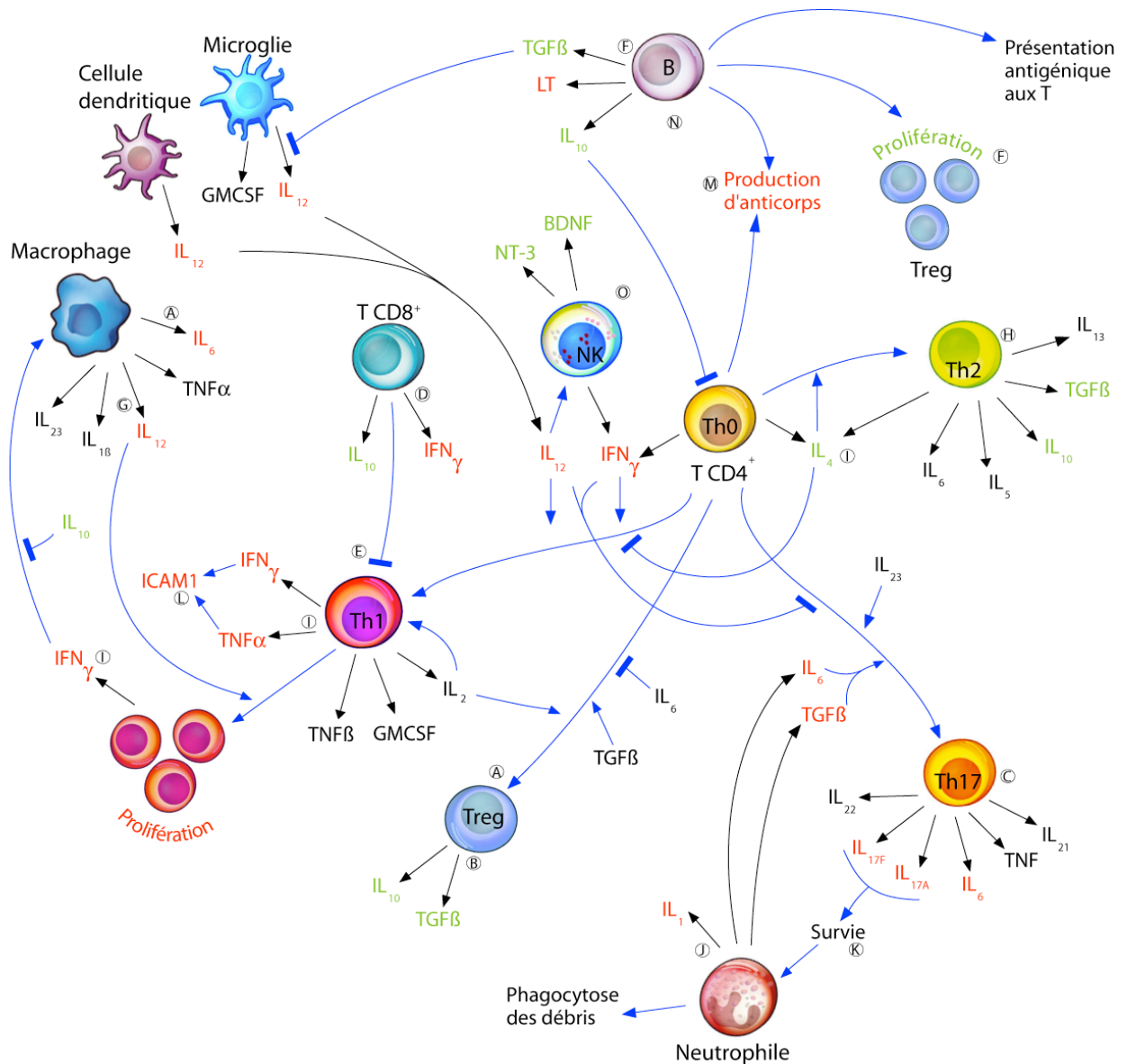


En ce qui concerne le rôle de présentation d'antigène des lymphocytes B, une étude a montré que l'administration d'anticorps anti-CD20 chez des souris induites avec de la MOG, diminue l'infiltration leucocytaire et la démyélinisation. Ces résultats s'expliquent par un manque de costimulation des lymphocytes T par les lymphocytes B ou un manque de présentation de l'antigène par les lymphocytes B aux lymphocytes T (Matsushita et al., 2008).

Un rôle régulateur des lymphocytes B a été suggéré car des souris déficientes en lymphocytes B développent une EAE sévère sans remissions, lorsqu'elles sont induites avec de la MBP. La sécrétion d'IL-10 par les lymphocytes B et l'expression de CD40 sont nécessaires à la rémission. Cette régulation proviendrait de l'interaction des lymphocytes B avec les lymphocytes T par les signaux de costimulation CD40 (CD40L étant exprimé à la surface des lymphocytes T). Mais des souris déficientes en CD40L sont également résistantes à l'EAE en raison d'un autre signal de costimulation CD28 qui permet également l'interaction des lymphocytes B et T, via les molécules B7 (CD80 et/ou CD86) présentes à la surface des lymphocytes T. En effet, des souris déficientes pour les deux molécules B7 développent une EAE atténuée. Par ailleurs, l'IL-10 a un rôle important, puisque les taux de cette cytokine sont élevés au pic de la maladie et pendant les phases de rémission, et les souris déficientes en IL-10 développent une EAE sévère (Mann et al., 2007).

Il faut aussi noter que les lymphocytes B peuvent être à l'origine de la formation d'agrégats lymphoïdes ectopiques cérébraux. Chez des souris EAE ayant une forme avec rechutes/remissions, la chimiokine CXCL13 est exprimée par des cellules présentes dans les méninges uniquement où de nombreux lymphocytes B sont également présents. Cette colocalisation résulterait en la formation de follicules lymphoïdes ectopiques, où les lymphocytes B activés subissent une expansion clonale et une sélection pour se différencier en lymphocytes B mémoires ou en plasmocytes. Le développement de tels follicules semble dépendant d'interactions cellulaires entre des lymphocytes B et T et des cellules dendritiques. Ces dernières sont responsables de la présentation antigénique aux lymphocytes B, ce qui entraîne la production de signaux de survie et de prolifération des lymphocytes B. La formation des follicules ectopiques semble également dépendante de la synthèse de cytokines comme la lymphotoxine et le TNF par les lymphocytes B qui induiraient la différenciation de précurseurs de cellules dendritiques. Mais malgré une infiltration massive de lymphocytes B dans le SNC, les souris DBA-1 induites avec de la MOG recombinante ne développent pas de follicules ectopiques, ce qui suggère que d'autres facteurs, antigènes et autres types cellulaires, interviennent dans le développement de ces follicules (Magliozzi et al., 2004). Les follicules ectopiques permettent d'expliquer la présence d'anticorps dans le liquide





(A) Oukka 2007  
(B) O'Connor 2008  
(C) Thakker 2007  
(D) Huseby 2001

(E) Jiang 1998  
(F) Mann 2007  
(G) Trinchieri 1993  
(H) Falcone 1997

(I) Lafaille 1998  
(J) Scapini 2000  
(K) Stromnes 2008  
(L) Lee 1999

(M) Nakajima 2000  
(N) Matsushita 2008  
(O) Winkler-Pickett 2008

**Figure 6 : Principales actions cytokiniques des différents effecteurs immunitaires intervenant dans la physiopathologie de l'EAE.** L'ensemble du système immunitaire est engagé dans le développement et le maintien de la maladie, en agissant notamment par des mécanismes de sécrétion de cytokines (flèche noire). L'environnement cytokinique oriente le rôle des acteurs cellulaires (flèche bleue). Les différentes actions résultantes et les cytokines sécrétées peuvent avoir un rôle délétère (rouge) ou bénéfique (vert) vis à vis de la pathologie.

céphalorachidien (LCR) des patients. Mais ces anticorps pourraient également provenir d'un passage des anticorps produits en périphérie au travers de la BHE ou de la BSLCR.

L'entrée des cellules immunes dans le SNC est très limitée en conditions physiologiques en raison de **l'organisation anatomique complexe du SNC**. En effet, aux différents compartiments du SNC que sont le parenchyme cérébral et médullaire, les ventricules et les espaces méningés, sont associés des barrières dont l'une des spécificités est le **contrôle de l'infiltration des cellules immunes dans le SNC**. Ces sites distincts d'entrée des leucocytes sont détaillés dans le chapitre suivant.

### III - ACCES DES CELLULES IMMUNES AU SYSTEME NERVEUX CENTRAL

#### III.1 - Les différents compartiments cérébraux

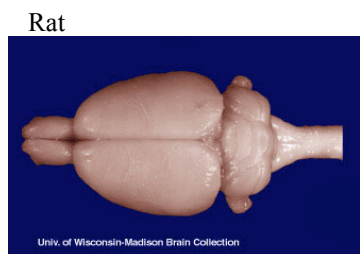
##### III.1.1 - Le parenchyme

Le SNC se compose d'un groupe de structures à symétrie bilatérale situées dans deux organes



**FIGURE 7 : Le névraxe chez l'homme et le rat.**

*Extrait de BenBrahim M, Medmatiq.xooit.com et brainmuseum.org*



principaux ; la moelle épinière, et le cerveau (Figure 7). Le cerveau est organisé en structures anatomiques différenciées qui communiquent de façon organisées entre elles et avec la moelle épinière. Au niveau tissulaire, le SNC est composé de neurones, chargés d'acheminer l'influx nerveux, et de trois types de cellules gliales, classiquement considérées comme un support et une protection pour les neurones, afin de maintenir l'homéostasie. Parmi elles, les astrocytes assurent un soutien aux neurones et participent à la clairance des

neurotransmetteurs (glutamate) au niveau des synapses afin de limiter leur toxicité. Les

oligodendrocytes forment la myéline et procurent un support et une isolation des fibres nerveuses (axones), améliorant la propagation de l'influx nerveux. Cette gaine de myéline délimite des faisceaux et confère la couleur blanche à cette substance. Cette matière blanche constitue principalement la partie interne de l'encéphale, la partie externe de la moelle épinière et comprend les tractus menant aux corps des neurones localisés dans la matière grise. Enfin, la microglie est constituée de cellules myéloïdes résidentes dans le SNC. Sa répartition ubiquitaire et sa mobilité lui permet de surveiller l'ensemble du SNC et constitue ainsi la première ligne de défense contre les pathogènes.

Pour assurer ces fonctions, le SNC est confiné dans la boîte crânienne et les vertèbres qui lui apportent support et protection. La moelle épinière et le cerveau sont également entourés de membranes spécialisées, les méninges, ayant un rôle de maintien et de protection. Enfin, le cerveau possède un système de circulation qui lui est propre, la circulation du LCR.

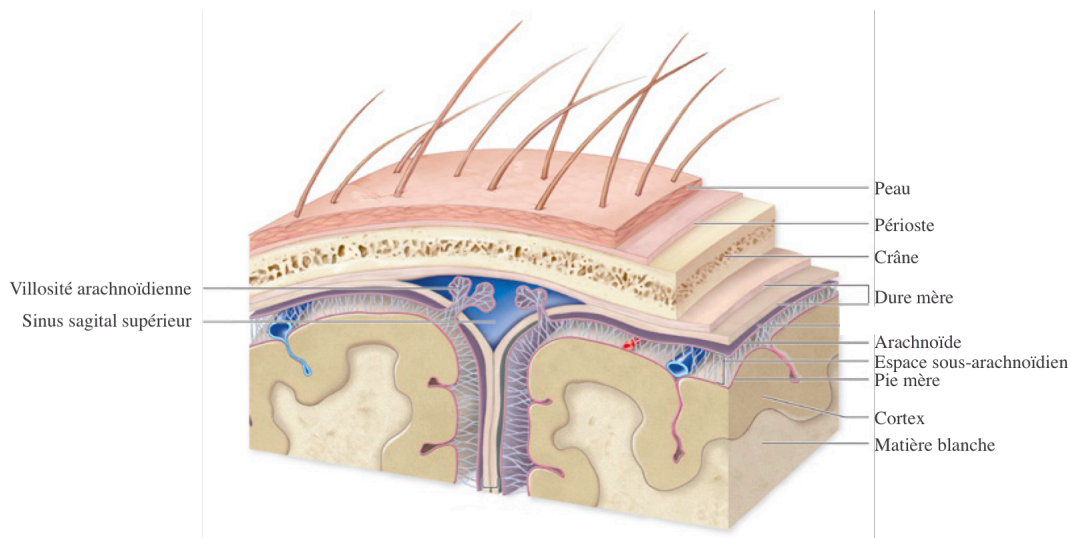
### III.1.2 - Les méninges

Le cerveau et la moelle épinière sont des structures délicates et semi-solides nécessitant protection et support. Ils sont enveloppés par un système de membranes, appelé les méninges. Elles sont composées de trois couches : à l'extérieur la dure mère, puis l'arachnoïde, et la pie mère à la surface du cerveau. Ces deux dernières étant physiquement connectées sont souvent considérées comme une seule couche, la pie-arachnoïde ou les leptoméninges (Figure 8).

La **dure-mère** est une méninge de protection, la plus externe, tapissant la paroi interne de la boîte crânienne, adhérente à elle, ou plus ou moins détachable suivant les régions. Elle est composée à la surface du crâne d'une couche adhérente qui est riche en vaisseaux sanguins et en nerfs, et d'une couche interne contenant des cellules plates. A certains endroits ces deux couches se séparent et forment les sinus veineux. Au niveau de la moelle épinière, ces deux couches se prolongent. Entre la face externe de la dure-mère et les vertèbres se forme alors l'espace épidural (extradural ou péri-dural). La dure-mère spinale se différencie de la dure-mère crânienne par la présence de nombreuses fibres élastiques qui permettent une grande flexibilité et extension lors des mouvements, et la présence de nombreux espaces intercellulaires formés par les cellules interdigitées (Vandenabeele et al., 1996).

L'**arachnoïde** est une méninge de glissement, séreuse à deux feuillets, appliquée à la face profonde de la dure-mère. Elle est non-vascularisée et étend des trabécules qui traversent l'espace sous-arachnoïdien, où circule le LCR, jusqu'à la pie-mère. A certains endroits comme le sinus supérieur sagittal, les leptoméninges forment des protrusions qui traversent la dure-mère pour former des granulations. Celles-ci sont composées de nombreuses villosités

arachnoïdiennes. Les villosités et granulations arachnoïdiennes sont considérées chez l'homme comme étant le site majeur de transfert de LCR au système veineux.



**Figure 8 : Schéma représentant les différentes meninges chez l'homme.** D'après

[http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201\\_mckinley/f15-4\\_cranial\\_meninges\\_c.jpg](http://academic.kellogg.edu/herbrandsonc/bio201_mckinley/f15-4_cranial_meninges_c.jpg)

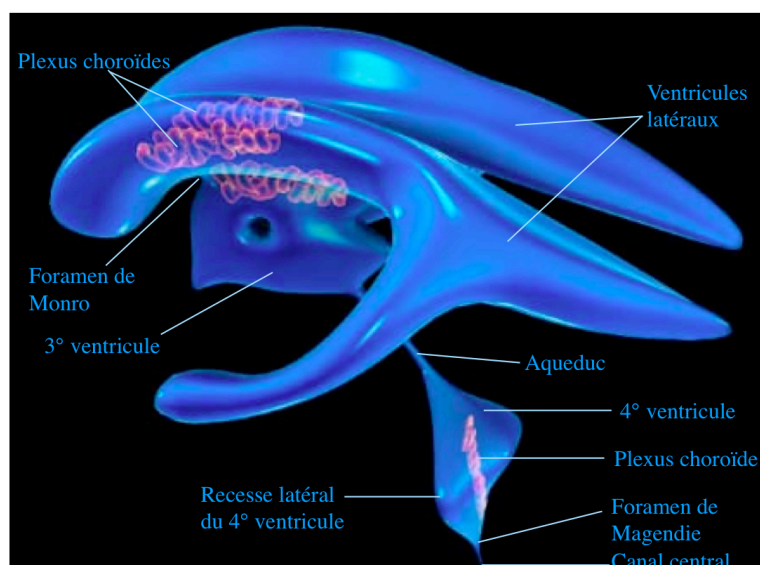
Enfin la **pie-mère** est une meninge nourricière pour les structures nerveuses sous-piales car la pie-mère est associée à de nombreux vaisseaux. Elle est appliquée à la surface du névraxe et épouse sa surface. Cette membrane est composée de deux couches, la pia-intima et l'épipiale. La pia-intima recouvre étroitement le tissu nerveux et est composée de fines fibres élastiques et réticulaires. Lorsque des vaisseaux pénètrent ou quittent le parenchyme cérébral, la pia-intima s'invagine à l'intérieur du parenchyme, ce qui forme un espace périvasculaire. La pia-intima collecte ses nutriments du LCR et du tissu adjacent. La couche épipiale est formée de réseaux de fibres de collagènes continues avec les trabécules de l'arachnoïde. Au niveau de la surface convexe du cerveau, la couche épipiale est absente, on ne la trouve qu'autour de la moelle épinière et des bulbes. L'épaisseur de la pie-mère est variable selon les régions cérébrales, par exemple elle peut être très fine (monocellulaire) et contenir des fenestrations exposant ainsi la lame basale de la glie limitante directement aux espaces sous-arachnoïdiens (Reina et al., 2004) ou alors être formée de plusieurs couches cellulaires comme au niveau du chiasma optique. La face interne de la pie-mère est très proche de la lame basale de la glie limitante car les cellules piales sont dépourvues de leur propre lame basale. Un autre type cellulaire est présent au sein de la pie-mère, il s'agit de macrophages. La pie-mère forme au niveau des toiles épendymaires ventriculaires, le stroma des plexus choroïdes (Gouazé, 1983).

### III.1.3 - Le liquide céphalorachidien et les compartiments liquidiens du cerveau

Le LCR baigne entièrement le SNC en occupant un compartiment interne aux structures cérébrales, constitué par le système ventriculaire, et des compartiments périphériques aux structures cérébrales tels que les *velae*, diverses citernes et les espaces sous-arachnoïdiens.

#### III.1.3 a -Le système ventriculaire

Le **système ventriculaire** de l'encéphale se compose de plusieurs cavités. Elles sont délimitées par l'épithélium épendymaire et contiennent le LCR. Dans chaque hémisphère cérébral se trouve un ventricule latéral qui forme deux extensions, une corne rostrale et une temporale. Ces deux ventricules latéraux communiquent par les foramens interventriculaires (ou foramens de MONRO) avec une cavité étroite, le troisième ventricule formé de deux parties dorsale et ventrale qui se rejoignent pour former l'aqueduc. Ce dernier est relié au ventricule mésencéphalique, et au quatrième ventricule, vaste et large cavité située entre le pont et la base du cervelet. Ce ventricule rejoint le canal central de la moelle épinière et débouche également dans la *cisterna magna* via le foramen médian (ou foramen de MAGENDIE). Le quatrième ventricule s'étend également de part et d'autre du pont formant ainsi les récesses latéraux. A chaque extrémité des récesses se trouvent les foramens latéraux (ou foramens de LUSCHKA) qui permettent le passage du LCR vers les espaces extraventriculaires. Ces ventricules communiquent donc entre eux, avec le canal central de la moelle épinière et avec les velums et les espaces sous-arachnoïdiens (Carpenter). Le système



**Figure 9 : Système ventriculaire chez l'homme.** Les plexus choroïdes en rouge sont la source majeure de LCR. *Extrait de BenBrahim M, Medmatiq.xooit.com*

ventriculaire du rat est similaire à celui de l'homme décrit ci-dessus (Levinger, 1971) à l'exception du récessus pinéal qui contrairement à celui de l'homme se trouve à la surface du cerveau. Il s'agit d'un prolongement de la partie dorsale du troisième ventricule.

### III.1.3 b -Les compartiments extraventriculaires

Parmi les compartiments extraventriculaires où circule le LCR, se trouvent les velums (velum interpositum, VI et velum médullaire antérieur), les citernes internes (citerne quadrigéminale et citernes ambiantes) et les espaces sous-arachnoïdiens incluant les citernes de la base. Ces compartiments internes sont le résultat des invaginations de la pie-mère qui tapisse toutes les sinuosités et replis du névraxe. Par exemple, venue des *colliculi*, la pie-mère se porte en avant pour tapisser la face supérieure du diencephale, c'est-à-dire sur la ligne médiane du troisième ventricule et, latéralement, la partie interne des thalamus. Arrivée à l'extrémité antérieure du diencephale, elle rencontre les colonnes du fornix ; elle se redresse alors, puis revient en arrière, en longeant la face inférieure du fornix, parvient au bord postérieur de celui-ci et sort alors de la fissure transverse du cerveau (séparant les hémisphères du cervelet). C'est au cours du développement que la pie-mère entoure le diencephale puis elle est elle-même recouverte par le prosencéphale. Ceci aboutit à la présence d'un feuillet direct et d'un feuillet réfléchi de la pie-mère qui constituent la toile choroïdienne du troisième ventricule et donc le VI. Le VI se forme au niveau de l'organe subfornical et se prolonge de part et d'autre du troisième ventricule jusqu'à la glande pinéale. Chez le rongeur, cette dernière est englobée dans la citerne quadrigéminale au-dessus du mésencéphale qui est reliée aux citernes ambiantes qui enveloppent le mésencéphale. Des cellules d'origine arachnoïdiennes semblent participer au réseau membranaires formant la trame des citernes ambiantes et quadrigéminale. A l'intérieur du VI convergent de nombreuses veines de la circulation profonde. Elles sortent au niveau supérieur, près de la glande pinéale, dans la citerne quadrigéminale pour ensuite rejoindre la veine de Galen. La veine cérébrale interne et ses tributaires ainsi que les artères choroïdiennes postérieures médiales sont retrouvées dans le VI. C'est au travers du VI que les plexus choroïdes latéraux se joignent pour former le plexus choroïde du troisième ventricule (Tubbs et al., 2008; Tubbs et al., 2011).

Des études *in vivo* de suivi de traceurs radioactifs injectés dans le LCR chez l'animal permettent de définir les relations de transfert de fluide entre les différents compartiments liquidiens et le parenchyme cérébral. L'entrée du traceur dans le parenchyme est fonction de nombreux facteurs tels que les pulsations artérielles, les concentrations et la taille des molécules, et diffère d'une structure cérébrale à une autre. Proescholdt *et al.* montrent que

l'hypothalamus et le mésencéphale semblent être des cibles privilégiées dans la diffusion de molécules via le LCR contrairement au thalamus ventral et postérieur, au cortex et caudate putamen. Ces régions cibles sont des sites où les mouvements cérébraux pulsatifs sont importants et ces sites sont au contact de fibres de substance blanche pouvant être considérées à la fois comme une barrière mais aussi comme un guide pour une meilleure diffusion (Proescholdt et al., 2000). En effet toutes les structures ne permettent pas la diffusion de molécules du LCR au parenchyme notamment dû à la présence de glie limitante, au niveau de certaines citernes, comme la citerne quadrigéminal, ce qui limite la diffusion dans les colliculi. Un autre passage existe entre les différents compartiments liquidiens ventriculaire et extraventriculaire. Après injection d'un composé tel que le sucrose au sein du ventricule latéral, celui-ci est détecté en quelques minutes dans le VI, suggérant un transport direct du troisième ventricule au VI médié par le LCR au travers de l'épendyme et de la membrane piale (Gherzi-Egea et al., 1996).

Enfin, les compartiments liquidiens extraventriculaires comprennent également les espaces sous-arachnoïdiens. Entre la pie-mère appliquée sur l'axe nerveux et l'arachnoïde appliquée sur la dure-mère se situent les **espaces sous-arachnoïdiens** dans lesquels circule le liquide céphalorachidien. Les espaces sous-arachnoïdiens contiennent des trabécules (filaments de tissu conjonctif) reliant l'arachnoïde à la pie-mère et permettant le maintien d'un espace à la surface des hémisphères cérébraux. A la base du cerveau et de la partie arrière du cervelet, l'arachnoïde est séparée de la pie-mère par de larges espaces qui communiquent les uns avec les autres et qui sont appelés **citernes** sous-arachnoïdiennes. Chez l'homme, la citerne la plus large se trouve entre la medulla et le cervelet et s'appelle la citerne cérébellomédulaire ou *Cisterna Magna*. Elle communique avec le quatrième ventricule par les foramens et avec les espaces médullaires. Elle contient les vaisseaux cérébelleux inférieurs et les amygdales cérébelleuses. D'autres citernes de taille considérable sont les citernes pontine, interpédonculaire, optochiasmatique. Mais d'autres citernes plus petites sont également présentes à la base du cerveau comme la citerne du tractus optique et la citerne de la lame terminale (Gouazé, 1983; Sakka and Chazal, 2005).



### III.1.3 c - La production et la circulation du LCR

Le site principal de production du LCR est constitué par les plexus choroïdes. Cependant, il est actuellement admis qu'une fraction du LCR provient d'autres sites, en particulier du parenchyme cérébral.

La **formation plexuelle** a lieu dans quatre régions. La toile choroïdienne du troisième ventricule se situe sur le toit de ce ventricule et forme le plexus choroïde du troisième ventricule. De ce plexus partent deux invaginations para-médianes qui s'insinuent latéralement dans les hémisphères cérébraux et forment les plexus choroïdes des ventricules latéraux. La toile choroïdienne du quatrième ventricule s'étire transversalement, s'insinue entre le cervelet et le pont et constitue latéralement les plexus choroïdes du quatrième ventricule. Les plexus choroïdes sont constitués de vaisseaux sanguins pelotonnés sur eux-mêmes et anastomosés, recouverts par une différenciation particulière de l'épithélium épendymaire qui comporte des cellules hautes, cylindriques et en monocouche.

La formation du LCR se fait en deux étapes : une ultrafiltration à travers les capillaires puis une sécrétion par les cellules épithéliales. Les échanges d'eau et d'ions se font par des mouvements intracellulaires à travers les membranes épithéliales ou par des mouvements intercellulaires à travers les jonctions serrées des cellules épithéliales (Brown et al., 2004; Praetorius, 2007). Le LCR est un véritable produit de sécrétion et non un ultrafiltrat plasmatique. Son pH est de 7,4 et il se compose à 99% d'eau. Le volume moyen chez l'homme est de 140 millilitres dont environ 25 millilitres sont contenus dans les ventricules. Chez le rat, le volume moyen est de 300 à 400 microlitres (Meek and Neff, 1973). Comparé au plasma, le LCR contient moins d'ions potassium et calcium, mais plus d'ions chlorures, sodium et surtout magnésium. Il est moins riche en glucose et surtout beaucoup moins riche en protéines, la principale étant l'albumine et la seconde la transthyrétine. Une faible quantité de cellules (1 à 5 cellules par millimètre cube) est observée dans le LCR d'individu sain.

La **formation extraplexuelle** correspond à l'eau provenant du métabolisme cellulaire du glucose au sein du parenchyme cérébral.

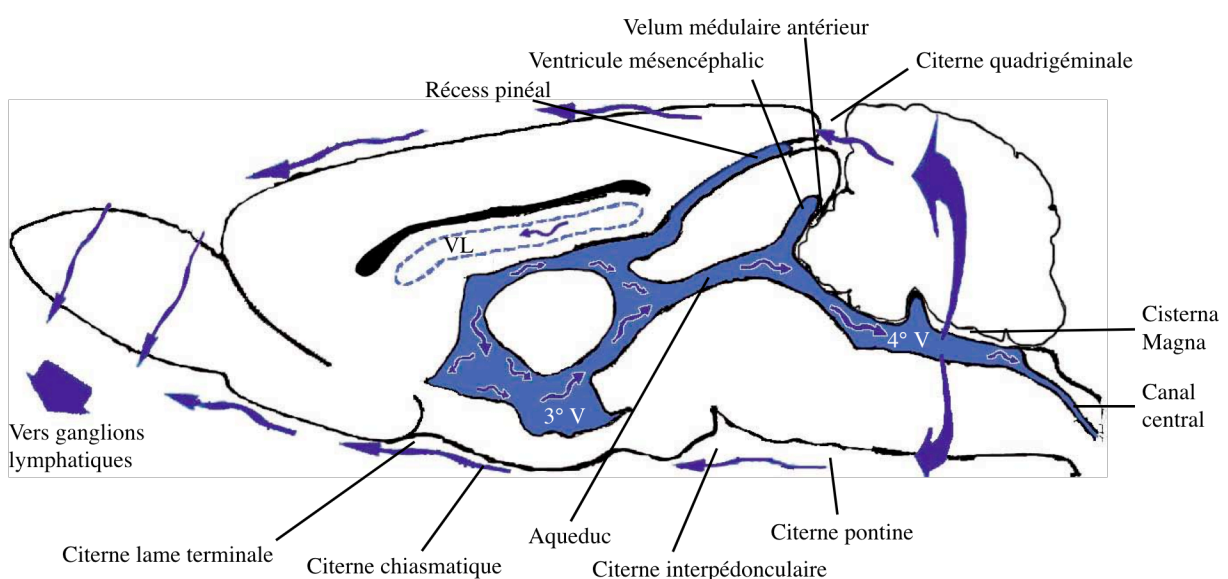
La contribution relative des formations plexuelle et extraplexuelle reste incertaine. Les résultats varient selon les études. Environ 70% à 90% du LCR est produit par les plexus choroïdes, et le reste dériverait de la production métabolique d'eau.

Le LCR est sans cesse renouvelé environ 400-500 millilitres sont produits par jour chez l'homme, soit un renouvellement de 4 à 5 fois par jour. Le LCR diffuse des ventricules, sites de production, vers l'espace sous-arachnoïdien, site de résorption. Le LCR formé dans les ventricules latéraux passe à travers les foramens dans le troisième ventricule puis par



l'aqueduc dans le quatrième ventricule. Pour finir, la majeure partie du LCR du quatrième ventricule passe dans les différentes citernes cérébrales, les velums et les espaces sous-arachnoïdiens superficiels par l'intermédiaire des forams latéraux et médians. Seule une petite quantité de LCR pénètre dans le canal central. Il existe donc plusieurs compartiments pour le LCR : un compartiment profond ventriculaire de sécrétion, un compartiment cisternal interne, et un compartiment superficiel sous-arachnoïdien de résorption. Le flux se fait essentiellement dans un sens crânio-caudal.

Les mécanismes qui permettent la propagation du LCR incluent le renouvellement permanent du LCR, l'action des cils présents sur les cellules épendymaires des ventricules, les pulsations cardiaques, les variations respiratoires et le gradient de pression à travers les villosités arachnoïdiennes. Deux flux peuvent être distingués, le flux en masse et le flux laminaire, dont les mécanismes sont différents et peuvent aboutir à des fonctions différentes. Le flux en masse a une direction rostro-caudale à partir du troisième ventricule et l'aqueduc vers le quatrième ventricule. Le LCR arrivant dans les espaces sous-arachnoïdiens circule de la cisterna magna soit rostralement au niveau cérébral soit caudalement au niveau lombaire. Chez le rat, le LCR circule dans le canal central à une vitesse de 1 cm/min en direction de la queue, débouchant via une ouverture (plusieurs chez le lapin et le cochon d'Inde) dans les espaces sous-arachnoïdiens (Veening and Barendregt, 2010). Le flux laminaire du LCR se produit le long des murs des ventricules et n'est pas restreint aux directions caudale et rostrale. Ce sont les cils des cellules épendymaires qui semblent être le principal facteur de ce flux. Les mouvements des cils contribuent au mélange du LCR (Figure 10).



**Figure 10 : Schéma de la circulation du LCR chez le rat.** Principaux compartiments liquidiens et direction des flux. Modifié de (Veening and Barendregt, 2010).

Chez l'homme, la majeure partie de la résorption du LCR a lieu dans les villosités arachnoïdiennes qui se trouvent dans les sinus veineux durs. Cette résorption correspond à un drainage du LCR vers le sang. Les villosités fonctionnent comme des valves unidirectionnelles. La résorption liquidienne dépend directement de la pression hydrostatique. Lorsque la pression du LCR augmente et dépasse la pression veineuse, le liquide quitte l'espace sous-arachnoïdien (Weller et al., 2009). Les vaisseaux lymphatiques de la dure-mère ainsi que ceux associés à certains nerfs crâniens, tel que les trijumeaux, sont également des sièges de résorption mais de moindre importance. Des études chez l'homme suggèrent une absorption du LCR au niveau spinal le long des nerfs spinaux et ceci pourrait représenter un tiers du volume absorbé. Ce volume est augmenté chez des individus en activité (Edsberg et al., 2004). Plus récemment, chez la plupart des animaux, il a été montré qu'au moins 50% du LCR et peut-être plus est drainé au travers de la lame criblée, par les espaces périneuraux de nerfs olfactifs et rejoint les ganglions lymphatiques (Veening and Barendregt, 2010).

Ainsi, le LCR se forme et se résorbe dans les ventricules et l'espace sous-arachnoïdien, respectivement. Il est en permanence en mouvement et diffuse sur toute la surface des hémisphères cérébraux et le long de la moelle épinière. Avec une vitesse de production constante et indépendante de la pression, la résorption est un mécanisme essentiel dans le maintien de l'homéostasie.

### III.1.3 d -Les rôles du liquide céphalorachidien

Le LCR a quatre principales fonctions : une fonction de protection physique et de soutien du système nerveux, une fonction excrétoire, une fonction de transport et enfin une fonction d'homéostasie.

Le LCR joue un rôle de tampon hydraulique et amortit les chocs, en diminuant le poids relatif du tissu nerveux : en suspension dans le LCR, un cerveau de 1500 grammes a un poids apparent de seulement 50 grammes. C'est un fluide protecteur car son volume s'adapte aux variations de volume des différents composants du cerveau, notamment le sang.

Le LCR est également le lieu d'excrétion de nombreux déchets du métabolisme. Grâce à sa vitesse de résorption, il a un rôle non négligeable dans le drainage et l'élimination de substances et même de cellules.

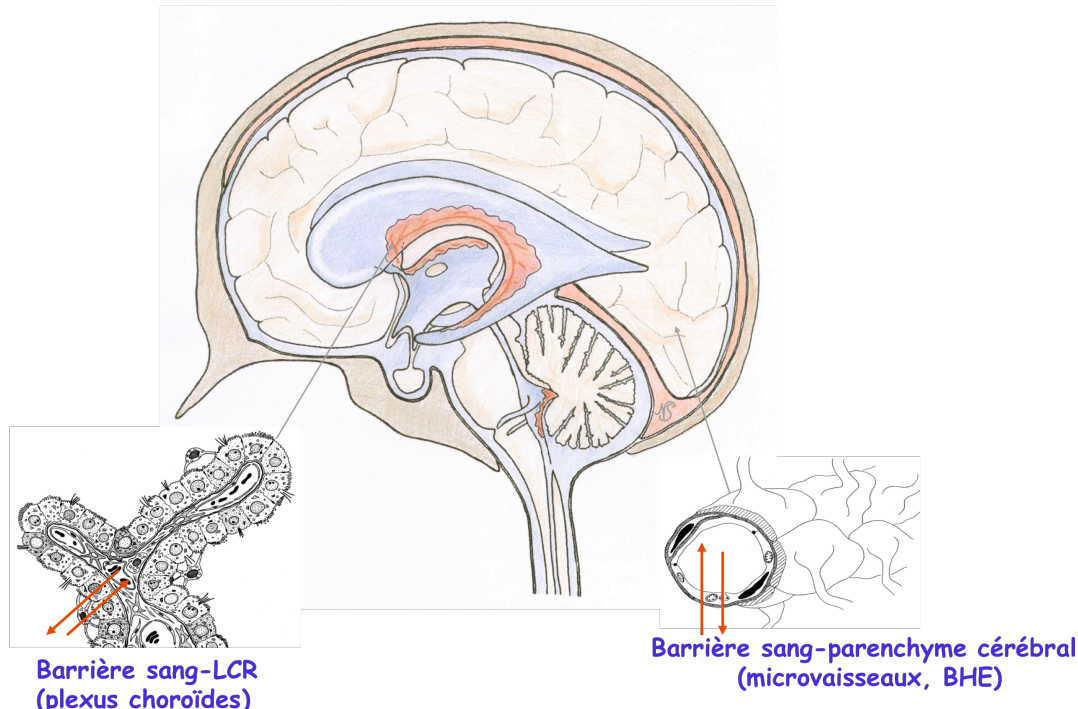
Le LCR circule le long de nombreuses régions du cerveau dont certaines ont un rôle endocrinien. Il sert donc de milieu de transport pour de nombreuses substances actives neuro-endocrines et également pour des neurotransmetteurs (Höistad et al., 2005; Proescholdt et al.,

2000). Les plexus choroïdes synthétisent eux-même des protéines, telle que la transthyréline, un transporteur des hormones thyroïdiennes (Dickson et al., 1986) et différents polypeptides à propriétés endocrines (Chodobski and Szmydynger-Chodobska, 2001).

Enfin, le LCR offre un milieu ionique stable, constituant un milieu de vie et de fonctionnement favorable aux cellules du tissu nerveux. Anatomiquement, le liquide interstitiel et le LCR sont en continuité et, par conséquent, la composition chimique du LCR exerce un effet direct sur les fonctions cérébrales. Les échanges hémato-liquidiens sont strictement contrôlés par le système de barrières (voir § III.2).

La principale fonction des méninges et du LCR est de protéger le SNC. Mais une protection physique et chimique est également conférée par les assises cellulaires formant les barrières entre le sang et le SNC.

### III.2 - Les barrières sang-cerveau



**Figure 11 : Les interfaces sang-cerveau.** Les plexus choroïdes forment la barrière sang-LCR et les capillaires cérébraux forment la barrière hémato-encéphalique. (Strazielle and Ghersi-Egea, 2005)

Deux systèmes distincts, la barrière hémato-encéphalique (BHE) et la barrière sang-liquide céphalorachidien (BSLCR), contrôlent l'homéostasie cérébrale (Figure 11). Cependant, les deux systèmes ne partagent pas les mêmes propriétés ni les mêmes fonctions.

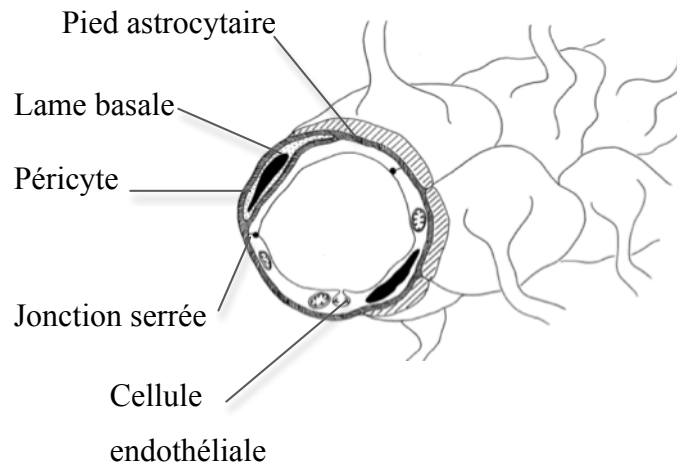
### III.2.1 - La barrière hémato-encéphalique

Le concept de BHE émerge grâce aux travaux de P. Ehrlich qui observe dès 1885 l'incapacité de marqueurs colorés à pénétrer dans le SNC. Cette étude est appuyée ensuite par M. Lewandowski qui suggère, pour la première fois, que la paroi des capillaires cérébraux pourrait bloquer l'accès de certaines molécules. Puis E. Goldmann démontre qu'un colorant injecté par voie intraveineuse est incapable de diffuser dans le SNC et le LCR malgré une coloration des plexus choroïdes et des méninges. Le terme de BHE apparaît en 1967 avec Reese et Karnovsky. La BHE est aujourd'hui connue comme une interface dynamique, dont les caractéristiques structurales et métaboliques sont le résultat de coopérations entre les cellules endothéliales, les péricytes et les astrocytes (Figure 12).

#### III.2.1 a -Le support anatomique

La BHE est localisée au niveau de la microvasculature cérébrale. Les propriétés de perméabilité sélective de la BHE sont attribuées à l'endothélium. Cependant il existe trois types cellulaires différents qui composent cette microvasculature et contribuent à la régulation des propriétés de barrière. Les microvaisseaux cérébraux sont constitués par une monocouche de cellules endothéliales reposant sur une membrane basale, à laquelle sont accolés des péricytes et des prolongements astrocytaires (Fenstermacher, 2000).

Les **cellules endothéliales** du SNC sont considérées comme le siège anatomique de la BHE. Ces cellules sont munies de caractéristiques morphologiques et enzymatiques particulières qui les différencient de l'endothélium périphérique. Elles sont unies entre elles au niveau apical, par un réseau de jonctions serrées et adhérentes, limitant la diffusion paracellulaire de solutés. Au contact direct de l'endothélium du côté abluminal se trouvent les **péricytes**, qui sont des cellules périvasculaires, appartenant au lignage musculaire lisse. Elles émettent des prolongements cytoplasmiques encerclant la paroi vasculaire et contribuent ainsi à la stabilité des microvaisseaux. Les péricytes semblent participer également à la régulation du diamètre capillaire et donc du flux sanguin, grâce à leur activité contractile (Dore-Duffy, 2003).



**Figure 12 : La barrière hémato-encéphalique.** (Strazielle and Gheri-Egea, 2005)

Les **astrocytes**, quant à eux, sont dans le parenchyme nerveux et contactent l'endothélium vasculaire et les péricytes par des prolongements cytoplasmiques appelés pieds astrocytaires. Ces derniers occupent un rôle important au niveau de la BHE car plusieurs études *in vitro* ont révélé la capacité des astrocytes à induire les propriétés de la BHE (Hayashi et al., 1997). Il n'existe pas de contact direct entre les astrocytes et les cellules endothéliales laissant suggérer que les astrocytes agissent par sécrétion de facteurs solubles.

Ces différents types cellulaires participent à la formation et au maintien d'une lame basale, entourant l'endothélium, constituée de protéines de la matrice extracellulaire comme le collagène et la laminine.

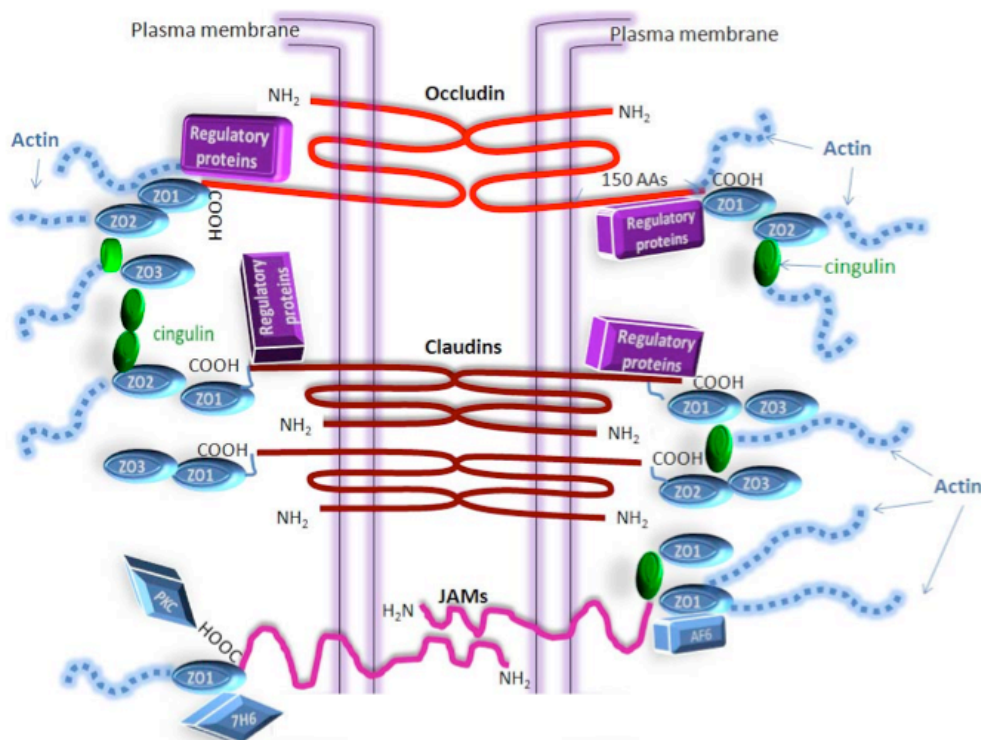
La description précédemment faite de la BHE n'est valable que pour les capillaires cérébraux. Les vaisseaux pré- et post-capillaires ont une physiologie qui diffère. En effet, les cellules endothéliales formant ces vaisseaux pré- et post-capillaires sont unies par des jonctions serrées caractérisées par une organisation et une densité moindre par rapport aux capillaires cérébraux. De plus, au niveau des vaisseaux plus larges, les pieds astrocytaires sont séparés de l'endothélium par un espace périvasculaire, appelé espace de Virchow-Robin qui est rempli de liquide interstitiel et contient des péricytes et des cellules phagocytaires (Bechmann et al., 2007). Dans ce cas, les phagocytes doivent être considérés comme participant aux fonctions de barrière en éliminant les pathogènes dans ces espaces. Les variations anatomiques des différents segments de l'arbre vasculaire seraient à l'origine de leurs différentes fonctions. En effet, les capillaires sont essentiellement impliqués dans le transport régulé des molécules alors que les veinules post-capillaires sont le siège du recrutement cellulaires dans le SNC lors d'inflammation (Engelhardt, 2006).

### III.2.1 b -La barrière physique

Comme vu ci-dessus, une caractéristique de la BHE est la présence d'un complexe jonctionnel intercellulaire.

Ce complexe est composé de jonctions serrées sous lesquelles se trouvent les jonctions adhérentes, les jonctions gap et les desmosomes qui s'organisent à partir de la lumière du capillaire. Les jonctions serrées sont constituées d'une combinaison de protéines transmembranaires et cytoplasmiques liées au cytosquelette d'actine. Ces complexes protéiques forment des joints mais sont sujets à des modulations et régulations rapides. Ces interactions induisent une polarisation de la cellule endothéliale.

Trois principales protéines transmembranaires forment ce complexe, les claudines, l'occludine et les molécules de jonctions adhérentes (JAM, junction adhesion molecule). Ces protéines forment des interactions homotypiques ou hétérotypiques avec la cellule adjacente (Piontek et al., 2008; Redzic, 2011). **L'occludine** a été identifiée comme la première protéine transmembranaire localisée dans les jonctions serrées. La partie cytoplasmique de cette protéine interagit avec des protéines accessoires, permettant un lien indirect avec le cytosquelette d'actine. Des études réalisées chez des souris déficientes en occludine ont montré que cette protéine ne semble pas indispensable à l'établissement des jonctions serrées. Ceci n'est pas le cas des autres protéines transmembranaires identifiées, les **claudines**, qui



**Figure 13 : Protéines formant les jonctions serrées et adhérentes.** *Extrait de (Redzic, 2011)*



colocalisent avec l'occludine et qui seraient les pièces maîtresses des jonctions serrées (González-Mariscal et al., 2003). La famille des claudines comprend de nombreux membres et la BHE est définie par la présence spécifique des claudines 3 (Nitta et al., 2003) et 5 (Witt et al., 2003) dans l'établissement des jonctions serrées endothéliales.

Ces protéines transmembranaires sont associées à des protéines accessoires intracytoplasmiques, telles que les **zonula occludens**, qui sont nécessaires au support structural et assurent la connexion au réseau d'actine.

Les jonctions serrées sont toujours situées à proximité d'une zone de contact appelée zone d'adhérence. Ces **jonctions adhérentes** remplissent plusieurs fonctions, comme l'initiation et la stabilisation de l'adhésion cellule-cellule, la régulation de l'organisation du cytosquelette d'actine mais aussi la régulation de la signalisation intracellulaire. Les principales protéines formant ces jonctions sont les cadhérines et les caténines.

Le passage moléculaire intracellulaire est limité par la faible quantité de vésicules de pinocytose, limitant ainsi les échanges non spécifiques entre le plasma et les fluides interstitiels (Nag, 2003).

### III.2.1 c -La barrière métabolique

En plus de la présence des jonctions serrées qui préviennent la diffusion moléculaire par les espaces interendothéliaux, la neuroprotection est également apportée par la présence de protéines de transport qui favorise l'influx de certains nutriments ou favorisent l'efflux de divers composants au travers des cellules. Les transporteurs responsables de l'influx et de l'efflux des nutriments endogènes ainsi que des xénobiotiques au niveau de la BHE appartiennent à deux grandes familles : les transporteurs SLC (Solute Carrier) et les transporteurs ABC (ATP-binding cassette) (Weiss et al., 2009).

Parmi les transporteurs SLC, certains transportent des substrats énergétiques, d'autres transportent des acides aminés (Pardridge, 1983) ou encore éliminent des médicaments hors du cerveau (Redzic, 2011).

Les transporteurs ABC ont la particularité d'être impliqués dans l'élimination des molécules potentiellement toxiques en dehors du cerveau. Il s'agit de pompe d'efflux qui permet un transport de molécules contre le gradient de concentration en utilisant de l'ATP. Les trois principales sous-familles impliquées sont ABCB1 (aussi appelée P-glycoprotéine) (Gazzin et al., 2008), ABCC (ou Multidrug Resistance Associated Proteins) et ABCG (ou Breast Cancer Resistance Protein) (Ginguene et al., 2010; Hartz and Bauer, 2011).

Tous ces éléments soulignent le caractère dynamique du contrôle qui est opéré au niveau de la BHE.

Les vaisseaux méningés sont souvent associés à la BHE mais leurs propriétés sont plus proches des vaisseaux pré- et post-capillaires. Deux différences distingueraient les vaisseaux piaux de leurs homologues cérébraux : la structure de leurs jonctions serrées (Cassella et al., 1996) qui n'assureraient pas une étanchéité complète, et l'absence de pieds astrocytaires au voisinage de l'endothélium vasculaire (Allt and Lawrenson, 1997). Au regard de ces spécificités anatomiques, les vaisseaux piaux constituent une interface sang-SNC particulièrement propice à l'infiltration de cellules immunes dans l'espace sous-pial. Ces caractéristiques anatomiques apportent un éclairage particulier sur les mécanismes induisant des réactions inflammatoires plus marquées dans les méninges que dans le parenchyme nerveux (Mason et al., 1986; Matyszak and Perry, 1996).

Ces caractéristiques de barrière sont retrouvées dans toutes les régions du SNC à l'exception des organes circumventriculaires et des plexus choroïdes qui ont leurs propres caractéristiques.

### III.2.2 - La barrière sang-liquide céphalorachidien

Cette barrière est située entre les vaisseaux sanguins des plexus choroïdes et le LCR. Les vaisseaux des plexus choroïdes sont différents des autres vaisseaux du cerveau car ils ne possèdent pas de jonctions serrées.

#### III.2.2 a -La structure anatomique

Les plexus choroïdes sont très largement vascularisés. Ces structures sont composées en extérieur de cellules épithéliales cubiques qui délimitent un stroma conjonctif où sont situés de larges vaisseaux fenêtrés (Figure 10). L'**épithélium** est en continuité avec l'épendyme tapissant les bords des ventricules mais en diffère par la présence de jonctions serrées au pôle apical des cellules.

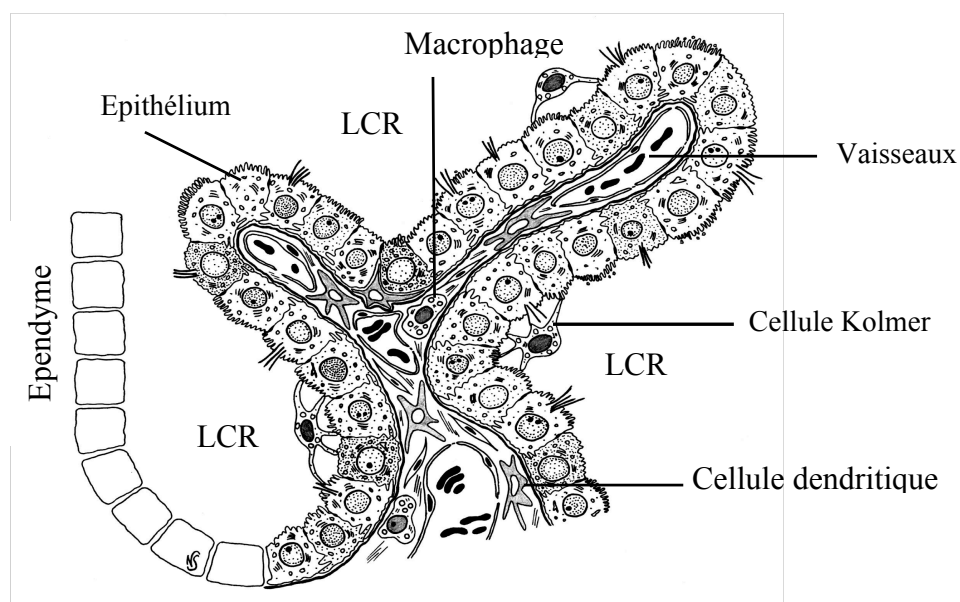
La couche de cellules épithéliales se replie formant ainsi des villosités autour de chacun des nombreux capillaires. Ces structures invaginées dans le LCR offrent donc une surface d'échange importante. De plus, les surfaces des membranes cellulaires sont elles-mêmes augmentées par la présence de microvillosités très denses au niveau apical et de nombreuses interdigitations au pôle basal des cellules. Prenant en compte ces caractéristiques morphologiques Keep and Jones (Keep and Jones, 1990) ont estimé la surface apicale des



plexus choroïdes à  $75 \text{ cm}^2$  et la surface basale à  $25 \text{ cm}^2$  chez un rat d'un mois, soit la moitié de la surface luminale développée par la BHE estimée à  $155 \text{ cm}^2$ .

Le **stroma** est séparé de l'épithélium par une lame basale continue et connectée aux membranes externes des leptoméniges. Ce tissu conjonctif contient les larges vaisseaux sanguins enchevêtrés dans un réseau lâche de fibres de collagène, produites par les fibroblastes présents dans ce stroma. D'autres cellules de la lignée des monocytes/macrophages sont présentes dans le stroma. Des études immunologiques chez le rat ont déterminé la présence de cellules dendritiques exprimant les molécules du CMH de type II. Un nombre limité de macrophages résidents a également été observé (McMenamin et al., 2003). Il a également été montré chez l'homme, la présence de cellules dendritiques dans les plexus choroïdes, dont certaines étaient localisées entre la lame basale et l'épithélium et émettaient des prolongements entre les cellules épithéliales (Serot et al., 1997).

Les cellules epiplexuelles intraventriculaires ou **cellules de Kolmer**, étroitement associées à l'épithélium choroïdien, sont considérées comme des éléments de ce tissu. Ces cellules libres à la surface de l'épithélium peuvent se présenter sous différentes formes, rondes, polarisées, étoilées, avec des nombres variés de pseudopodes. Ces cellules présentent des caractéristiques morphologiques identiques aux macrophages telles que des vacuoles et des lysosomes (Strazielle and Gherzi-Egea, 2000).



**Figure 14 : Villosité choroïdienne.** D'après (Strazielle et al., 2005)

### III.2.2 b -La barrière physique

La barrière effective est constituée par les cellules épithéliales qui sont liées entre elles par des jonctions serrées. Le principal complexe jonctionnel (Figure 13) des cellules épithéliales est situé au niveau apical des cellules, et permet de réduire fortement la diffusion paracellulaire des composés polaires dans le SNC. L'épithélium choroïdien ne constitue cependant pas une barrière aussi étanche que l'endothélium cérébral. En effet, la résistance électrique transépithéliale n'est que de quelques dizaines ou centaines d'ohms.cm<sup>-2</sup>, alors que la résistance électrique transendothéliale se mesure en milliers d'ohms.

Les jonctions serrées de l'épithélium des plexus choroïdes diffèrent de celles de l'endothélium cérébral par sa composition en claudines qui comprend les claudines 1, 2 et 3 mais pas la claudine 5. La claudine 2 est particulièrement connue pour être impliquée dans des jonctions de faible résistance (Strazielle et al., 2005).

La présence de ces jonctions ne contrôle pas seulement la voie paracellulaire mais assurent également la distribution polarisée de protéines membranaires, de canaux, récepteurs, ou enzymes. La ségrégation de ces protéines entre domaines membranaires apical et basolatéral est fondamentale pour de nombreuses fonctions de l'épithélium choroïdien.

### III.2.2 c -La barrière métabolique

De nombreux mécanismes de transport d'influx et d'efflux de solutés, et des mécanismes métaboliques en font une interface d'échanges dynamique. Ainsi, des nutriments et micronutriments sont transportés à travers l'épithélium grâce à des transporteurs qui leurs sont spécifiques (Roberts et al., 2008; Strazielle and Gherzi-Egea, 2000). Mais, d'autres transporteurs à spécificité plus large permettent l'efflux hors du LCR de nombreux solutés endogènes tels que des eicosanoïdes ou des métabolites de neurotransmetteurs, et de composés exogènes tels que des toxiques organiques ou des médicaments. Ces mécanismes limitent l'entrée dans le LCR de composés présents dans le sang et dont leur degré de lipophilie les rend susceptibles de traverser les membranes cellulaires. Les transporteurs d'efflux impliqués appartiennent à différentes familles de protéines de transport. En particulier des protéines de résistance multiple aux médicaments (MRP ou multidrug resistance associated protein) sont localisées sur la membrane basolatérale, tandis que des protéines de transport d'anions et de cations organiques (OAT et OCT, ou Organic Anion and Cation Transporters) et un transporteur de peptide sont localisés sur la membrane apicale des

cellules (Gazzin et al., 2008; Ghersi-Egea and Strazielle, 2002). De plus, des taux très élevés d'enzymes de détoxification, telles que l'hydrolase epoxique, l'UDP-glucuronosyl transférase, la glutathion peroxidase et la superoxide dismutase, montrent l'importance des plexus choroïdes dans les mécanismes de détoxification du cerveau (Strazielle et al., 2004).

### III.2.3 - Les organes circumventriculaires

Les organes circumventriculaires (OCV) sont les seules structures du parenchyme cérébral ne possédant pas de BHE. Ils sont situés le long des troisième et quatrième ventricules et sont constitués des organes subfornical, vasculaire de la lame terminale, subcommissural, de la glande pinéale, de l'éminence médiane, de l'aréa postrema, du lobe neural de l'hypophyse. Physiologiquement, ces OCV jouent un rôle dans le contrôle de l'homéostasie (pression artérielle, équilibre hydrique...) (Gross, 1992). Richement vascularisés, ces structures permettent le passage de diverses molécules dans le parenchyme, car à l'exception de l'organe subcommissural, les vaisseaux sanguins qui les parcourent ne présentent pas de jonctions serrées, contrairement aux microvaisseaux du parenchyme précédemment décrits. Des travaux réalisés sur l'éminence médiane ou l'organe subfornical ont en effet révélé la présence de cellules épendymaires spécialisées, les tanocytes, émettant des prolongements basaux qui s'étendent dans le parenchyme de l'organe pour former des pieds terminaux autour des vaisseaux sanguins (Mullier et al., 2010). Les tanocytes unis entre eux et avec les cellules épendymaires par des jonctions serrées, permettent ainsi un contrôle stricte des échanges entre ces OCV et le ventricule.

### III.3 - L'interaction particulière entre le système immunitaire et le SNC

Pour que le SNC assure ces fonctions, un parfait maintien de l'homéostasie est exigé. Notamment une surveillance immunitaire au travers du recrutement de leucocytes périphériques dans le cerveau permet un contrôle précis de la présence de micro-organismes pathogènes, et leur élimination via une réaction inflammatoire.

Cependant, le cerveau et la moelle épinière sont enfermés dans la boîte crânienne et la colonne vertébrale, et par conséquent ne peuvent pas tolérer une accumulation cellulaire excessive, ni les œdèmes souvent associés aux inflammations périphériques. C'est pourquoi

les interactions entre le SNC et le système immunitaire sont particulières, et ne correspondent pas aux mécanismes de protection retrouvés dans les autres organes.

### III.3.1 - L'immunoprivilège du système nerveux central

Le concept de privilège immun associé au SNC a émergé au début du XXe siècle, notamment grâce à de nombreuses études réalisées par différents investigateurs qui ont clairement démontré qu'il est plus difficile d'initier des réponses immunes médiées par des lymphocytes T à l'intérieur du parenchyme cérébral qu'en dehors du SNC. En effet les études de Shirai, Murphy et Sturm ont démontré que les greffes de tumeurs xenogéniques persistent plus longtemps dans le parenchyme nerveux qu'en périphérie, et ont suggéré que cette survie pourrait dépendre d'un défaut de réponse du système immunitaire dans le parenchyme nerveux. Une étude de la réponse immune développée suite à l'injection du Bacille de Calmette et Guérin supporte également cette idée, puisque comparée à la réponse périphérique l'injection centrale provoque uniquement le recrutement de macrophage et non de lymphocytes pro-inflammatoires (Matyszak and Perry, 1998). La difficulté d'initier une réponse inflammatoire est également observée chez des souris transgéniques dont plus de 95% les lymphocytes T sont spécifiques d'antigènes du SNC, tel que la MBP, et qui ne développent pas d'infiltrats, ni de démyélinisation ni de signes cliniques de l'EAE, tant qu'elles sont maintenues dans un environnement dénué de pathogènes (Brabb et al., 1997). Ces données indiquent clairement une habilité différente d'initiation de réponses T contre les antigènes lorsqu'ils sont présents dans le SNC.

Parallèlement, plusieurs observations sont venues conforter l'idée du privilège immun. Tout d'abord, la découverte de la BHE (détaillée ci-dessus), définie comme une interface isolant le parenchyme nerveux de la périphérie, a instaurée le concept d'un frein membranaire à l'entrée des cellules immunes dans le SNC. Egalement, l'absence d'un système classique de drainage lymphatique associé à l'absence de CPA, telles que les cellules dendritiques dans le parenchyme nerveux (Pashenkov et al., 2003), sont apparues comme de nouveaux éléments défavorables au développement d'une réponse immune cellulaire efficace. Et enfin, un autre élément contribuant au statut immunologique contrôlé du SNC est la très faible expression des molécules de CMH sur les cellules nerveuses non activées, et l'impossibilité de la microglie et des macrophages résidents à présenter l'antigène, ce qui prévient toute activation lymphocytaire (Frohnman E, J Clin Immunol 1989). Ainsi, le SNC s'est peu à peu imposé

comme un site ‘immuno-privilégié’ caractérisé par une réponse immune cellulaire étroitement contrôlée.

Les trente dernières années ont connu une importante remise en cause du concept de privilège immunitaire du SNC.

En effet, les travaux de W.F. Hickey ont démontré que les lymphocytes T, une fois activés, pouvaient pénétrer efficacement dans le parenchyme nerveux (Hickey, 1991). L’infiltration de ces cellules immunes dans le SNC est un phénomène rapide et transitoire lorsqu’il est associé à l’activation cellulaire précoce. Par contre, si les lymphocytes T rencontrent leur antigène spécifique dans le SNC il s’ensuit une activation et une prolifération clonale de ces cellules (Hickey, 2001). Le système immunitaire assure donc une surveillance physiologique du SNC qui donne lieu le cas échéant à une réponse neuro-inflammatoire.

De plus, en dépit de l’absence d’un réseau lymphatique, il existe malgré tout un drainage de type lymphatique des antigènes présents dans le parenchyme cérébral qui permet le transport vers les organes lymphoïdes secondaires, notamment les ganglions (Kida et al., 1993; Koh et al., 2005) où peut s’initier la réponse immune cellulaire. Ce drainage prend essentiellement la forme d’un transport d’antigènes libres via le LCR. La présence de cellules dendritiques au sein du LCR d’un individu sain et l’augmentation de leur nombre au cours de neuropathologies (Pashenkov et al., 2001) laisse envisager l’existence d’un mécanisme de drainage antigénique lié à ces cellules. Des études chez le rat ont montré qu’en conditions physiologiques (Hatterer et al., 2006) comme en conditions inflammatoires (Hatterer et al., 2008) les cellules dendritiques injectées dans le LCR migrent dans les ganglions cervicaux. Dans ces cas, l’absence de présentation antigénique conférée au SNC est donc remise en cause. Les cellules dendritiques pourraient également exercer leur action de présentation de l’antigène directement dans le parenchyme cérébral où elles ne sont toutefois présentes qu’en conditions inflammatoires (Matyszak and Perry, 1996). En effet, une étude démontre que les cellules dendritiques isolées du SNC de souris, développant une EAE, sont capables d’activer des lymphocytes T naïfs avec un TCR spécifique de l’antigène (McMahon et al., 2005).

Ainsi, la principale remise en cause du concept de privilège immunitaire du SNC tient à son organisation en compartiments différents, dans lesquels l’intensité et la cinétique de déclenchement de la réponse immune varieraient. Ainsi, plusieurs études ont démontré que, contrairement au parenchyme nerveux (le neuropile), la réactivité immunitaire des plexus choroïdes et des méninges était semblable à celle décrite en périphérie (Matyszak and Perry, 1996). En effet, la présence de CPA fonctionnelles en conditions physiologiques a été

observée dans les espaces périvasculaires (Hickey and Kimura, 1988; Williams et al., 2001), les plexus choroïdes (Ling et al., 1998; Matyszak and Perry, 1996), les ventricules et les méninges (McMenamin et al., 2003) et non dans le neuropile. Ces cellules localisées stratégiquement au niveau des sites d'accès au SNC pourraient, le cas échéant, phagocyter des agents pathogènes potentiellement délétères, apprêter les antigènes qui en résultent et les présenter aux lymphocytes T soit *in situ*, soit après acheminement dans les ganglions cervicaux. Le privilège immunitaire a par conséquent été reconsidéré comme un concept qui loin de refléter une situation générale dans le SNC était principalement restreint au parenchyme nerveux.

Les caractéristiques spécifiques de chaque compartiment sont à l'origine d'un contrôle différentiel de l'infiltration des cellules immunes.

### III.3.2 - La surveillance neuro-immunitaire

Les opinions divergent concernant les mécanismes impliqués dans l'immunosurveillance et ces différences sont en partie dues aux méthodes expérimentales utilisées lors des analyses. La limite entre surveillance immunitaire et initiation d'une pathologie est difficile à déterminer. Elle peut être déterminée par le stade d'activation des vaisseaux sanguins du SNC. Les études physiologiques seront traitées dans ce paragraphe puis les études basées sur l'EAE par transfert adoptif seront mentionnées dans le paragraphe suivant.

Un nombre très limité de lymphocytes T est retrouvé dans le SNC d'un individu sain. Leur présence est due à leur capacité à franchir les barrières existantes entre le sang et le SNC, précédemment décrites. La surveillance du SNC est donc différente de celle des autres organes sur le plan quantitatif puisque le nombre de cellules immunes pénétrantes est limité par la faible expression de molécules d'adhésion à la surface des cellules formant la BHE et la BSLCR.

Tout d'abord concernant l'endothélium des capillaires. Une étude utilisant la microscopie intravitale a analysé le comportement de lymphocytes T naïfs, activés ou autoréactifs à la surface des vaisseaux méningés cérébraux sans ouverture de la boîte crânienne. Aucune interaction avec l'endothélium des vaisseaux n'est établie lorsque ces derniers ne sont pas activés (Piccio et al., 2002). D'autres études ont montré un passage des lymphocytes activés au travers d'un endothélium inactif. Cependant elles ont été réalisées sur des modèles *in vivo*

de transfert adoptif d'EAE dont le phénotype sur-activé des lymphocytes ne correspond pas à l'immunosurveillance. Dans le cadre de la surveillance neuro-immunitaire, le passage des lymphocytes au niveau de la BHE est donc très limité.

L'analyse du phénotype des lymphocytes présents dans le SNC de la souris en conditions physiologiques montre qu'une partie d'entre eux expriment la PSGL1 (P-selectin glycoprotein ligand ou CC162), ligand de la sélectine P, E et L. Ceci suggère l'implication de ces molécules d'adhésion dans la migration des lymphocytes. En effet, plusieurs études ont détecté par immunohistochimie l'expression des sélectines E et P stockées dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales des vaisseaux méningés et du stroma des plexus choroïdes chez les souris SJL/J et C56BL/6 (Carrithers et al., 2002; Döring et al., 2007). Donc la présence de ces deux molécules, connues pour être nécessaires à l'adhésion et au roulement des leucocytes sur les vaisseaux, suggèrent que ces sites soient impliqués dans le recrutement de lymphocytes dans le cadre de la neurosurveillance. Cette observation est appuyée par une analyse réalisée chez l'homme sain. Il a été montré qu'une expression constitutive des sélectines E et P est détectée au niveau des cellules endothéliales des veinules larges associées aux membranes arachnoïdiennes et des stroma des plexus choroïdes alors que cette expression est négative en ce qui concerne les vaisseaux du parenchyme. De plus, l'analyse phénotypique des lymphocytes présents dans le LCR montre, comme chez la souris, qu'ils expriment PSGL1 (Kivisäkk et al., 2003). Sur la base de ces résultats, les auteurs ont proposés que les lymphocytes T pénètrent dans le LCR via les plexus choroïdes. Cependant, le mécanisme de passage des cellules au travers de l'épithélium choroïdien n'est pas élucidé avec précision. Une étude a récemment mis en évidence un mécanisme impliqué dans la migration des lymphocytes Th17 au travers de l'épithélium choroïdien chez des souris. Ces lymphocytes expriment à leur surface un récepteur de chimiokines CCR6 dont le ligand CCL20 est exprimé constitutivement au niveau de l'épithélium choroïdien et non par les cellules de la BHE. Cette interaction pourrait favoriser le passage des lymphocytes CCR6<sup>+</sup> dans le LCR. En effet, des souris déficientes en CCR6 montrent une accumulation de cellules immunes dans le stroma plexus choroïdes (Reboldi et al., 2009).

Nous avons décrit précédemment que certains macrophages et la microglie sont résidents dans le SNC mais ces cellules, en particulier les macrophages, doivent être renouvelées. Chez le rat, environ 30% des cellules périvasculaires sont remplacées au bout de 3 mois par des progéniteurs d'origine sanguine (Soulas et al., 2009) alors que moins d'un pourcent de la microglie est remplacée en 90 jours (Williams et al., 2001). Concernant la microglie, le renouvellement se produit en grande majorité par la division cellulaire (Nottet, 1999). Pour



permettre les processus de renouvellement, des monocytes sanguins doivent pénétrer dans le cerveau dans des conditions physiologiques sans activation de la BHE. Très peu d'études ont été menées sur ce mécanisme, les partenaires moléculaires impliqués sont donc inconnus.

Plusieurs hypothèses sont proposées concernant les voies d'entrées impliquées dans la migration de ces cellules immunes. Il pourrait s'agir d'un passage au travers de la BHE, un passage au niveau de la BSLCR ou encore un passage au niveau des méninges. Au vu des études récentes concernant les lymphocytes T mentionnées précédemment, l'implication des plexus choroïdes dans la migration de divers types de cellules immunes nécessite une reconsidération.

Il est important de comprendre si au cours d'inflammations périphériques ou centrales, les voies d'entrée précédemment décrites sont similaires ou si d'autres processus existent.

### III.3.3 - Voies d'infiltration des cellules immunes dans le SNC au cours de l'EAE

#### III.3.3 a - Le mécanisme classique

Au cours de l'EAE, les lymphocytes traversent l'endothélium activé des vaisseaux, selon un processus de migration qui a été largement caractérisé au niveau des vaisseaux périphériques. La migration consiste en différentes étapes, qui sont, le ralentissement du lymphocyte, le roulement, l'activation du lymphocyte, l'adhésion forte à l'endothélium, et enfin l'extravasation. Les caractéristiques spécifiques des vaisseaux du SNC impliquent un contrôle particulier de la migration des lymphocytes.

Des études d'immunohistochimie révèlent l'expression de molécules d'adhésion telles qu'ICAM-1 et VCAM-1 (Vascular cell adhesion molecule) à la surface des vaisseaux parenchymateux au cours de l'EAE (Engelhardt and Ransohoff, 2005; Ledebor et al., 2003; Steffen et al., 1994), suggérant leur implication dans le recrutement des cellules. Les deux intégrines, LFA-1 (lymphocyte function associated antigen 1) et VLA-4 (very late antigen 4) à la surface du lymphocyte vont interagir fermement avec ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1) et VCAM-1 respectivement (Kerfoot and Kubes, 2002; Piccio et al., 2002). Ces hypothèses ont été confirmées à la fois *in vitro* et *in vivo* (Bartholomäus et al., 2009). Ces études ont montré que VCAM-1 est responsable de l'adhésion du lymphocyte à la surface de l'endothélium (Laschinger and Engelhardt, 2000) et que ICAM-1 et ICAM-2 interviendraient dans le passage au travers de l'endothélium (Reiss and Engelhardt, 1999). Une étude *in vitro* plus récente a défini plus précisément les rôles de VCAM-1 et ICAM-1 dans l'étape d'arrêt



du lymphocyte à la surface de l'endothélium, et d'ICAM-1 et ICAM-2 dans la polarisation et le roulement du lymphocyte (Steiner et al., 2010). Il existe deux hypothèses pour expliquer le mécanisme d'extravasation : un passage du lymphocyte par la voie paracellulaire entre deux cellules endothéliales impliquant une rupture transitoire des jonctions serrées, ou un passage au travers d'une cellule endothéliale, la voie transcellulaire, où des structures membranaires en forme de coupe englobent le lymphocyte (Carman and Springer, 2004; Wolburg et al., 2005). Récemment, ALCAM-1 a été décrite dans les cellules endothéliales cérébrales au cours de l'EAE et son inhibition réduit la sévérité de l'EAE et limite la migration des lymphocytes et des monocytes au travers de la BHE (Cayrol et al., 2008). D'autres études doivent être menées afin de préciser son implication dans le processus de migration des lymphocytes.

Une fois la paroi endothéliale traversée, les cellules immunes qui se retrouvent dans l'espace périvasculaire doivent franchir la glie limitante. Bien que l'espace de Virchow-Robin ait fait l'objet de nombreuses recherches ces dernières années, son importance dans le recrutement de cellules immunes au sein du SNC ne s'est imposée que très récemment (Wuerfel et al., 2008). L'arrivée des lymphocytes T dans l'espace périvasculaire s'accompagne d'une série de freins à l'accès dans le parenchyme nerveux. Le premier est lié au besoin des lymphocytes T d'être restimulés dans l'espace de Virchow-Robin. C'est ce que révèlent les travaux de Tran *et al.* sur un modèle d'EAE, démontrant que l'élimination des macrophages périvasculaires, sans effet sur le passage transendothélial, inhibe la migration au travers de la matrice extracellulaire et les lames basales, entraînant une accumulation leucocytaire dans cet espace (Tran et al., 1998). D'autres études montrent également la présence d'une faible population de cellules dendritiques dans l'espace périvasculaire pour restimuler les lymphocytes T et induire une EAE (Greter et al., 2005). Le deuxième frein rencontré par les lymphocytes T lors de la migration est l'action pro-apoptotique des astrocytes. En effet, les pieds astrocytaires qui forment la glie expriment constitutivement la protéine pro-apoptotique Fas ligand (CD95L) (Bechmann et al., 1999), qui peut se lier avec le récepteur Fas (CD95), présent à la surface des lymphocytes, et ainsi entraîner la mort cellulaire par apoptose. Enfin, la barrière physique que constituent la matrice extracellulaire et les lames basales représente le dernier frein connu à l'infiltration lymphocytaire dans le SNC. Le franchissement est sous la dépendance des métalloprotéases matricielles (MMP) dont le profil d'expression semble être déterminant. Des travaux ont montré l'importance de MMP-2 et -9 dans le recrutement de lymphocytes T de souris ayant une EAE (Agrawal et al., 2006). Les macrophages pourraient avoir un rôle direct

ou indirect dans l'altération de la glie limitante, induisant un remodelage de celle-ci afin de permettre la migration des lymphocytes dans le parenchyme. Les macrophages et les neutrophiles peuvent être source de MMP ou de cathepsines pour dégrader la glie. Les macrophages peuvent également produire de dérivés d'oxygène actifs, molécules activatrices des MMP (Savarin et al., 2010).

Parvenus dans le parenchyme, pour migrer au sein du SNC, les lymphocytes T vont pouvoir suivre les gradients de cytokines et de chimiokines sécrétées par les cellules environnantes.

Les différentes études mentionnées ci-dessus ont permis de détailler les mécanismes de migration des cellules immunes au travers de l'endothélium activé des vaisseaux du parenchyme. Cependant ce mécanisme de migration classique ne permet pas d'expliquer la localisation préférentielle des zones d'infiltrations, telles que les structures périventriculaires et sous-piales. Il est donc nécessaire d'évaluer l'implication des autres sites potentiels d'entrée de leucocytes dans le SNC, qui sont les OCV, les méninges et les plexus choroïdes

### III.3.3 b -Les passages alternatifs

Peu de travaux ont été réalisés concernant la migration de leucocytes au niveau des **OCV**. Une étude a montré l'expression des molécules d'adhésion cellulaires VCAM-1 et ICAM-1 à la surface luminale des vaisseaux présents dans les OCV (Schulz and Engelhardt, 2005). Hormis l'éminence médiane qui semble privée de VCAM-1, les microvaisseaux des OCV pourraient ainsi être le siège d'un recrutement cellulaire impliquant les molécules ICAM-1 et VCAM-1. Mais la faible proportion de leucocytes exprimant VLA-4 parmi ceux rencontrés dans les OCV conduit à s'interroger sur l'existence d'un mécanisme alternatif pour expliquer le recrutement de cellules immunes au niveau des OCV.

L'hypothèse d'une voie d'entrée par **les méninges** résulte de l'observation d'accumulation de leucocytes dans les espaces sous-arachnoïdiens au cours de pathologies inflammatoires telles que l'EAE (Bartholomäus et al., 2009; Brown and Sawchenko, 2007; Kawakami and Flugel, 2010) et à la suite d'injection de lymphocytes activés (Piccio et al., 2002). Les études réalisées par vidéomicroscopie après transfert adoptif montrent une augmentation intraluminale du nombre de lymphocytes T spécifiques pour la MBP, suivit d'une augmentation de l'extravasation de ces cellules au travers des vaisseaux piaux de la moelle épinière (Bartholomäus et al., 2009; Kawakami and Flugel, 2010). Des observations similaires ont été identifiées chez des souris EAE, avec une activation de la microglie dans les

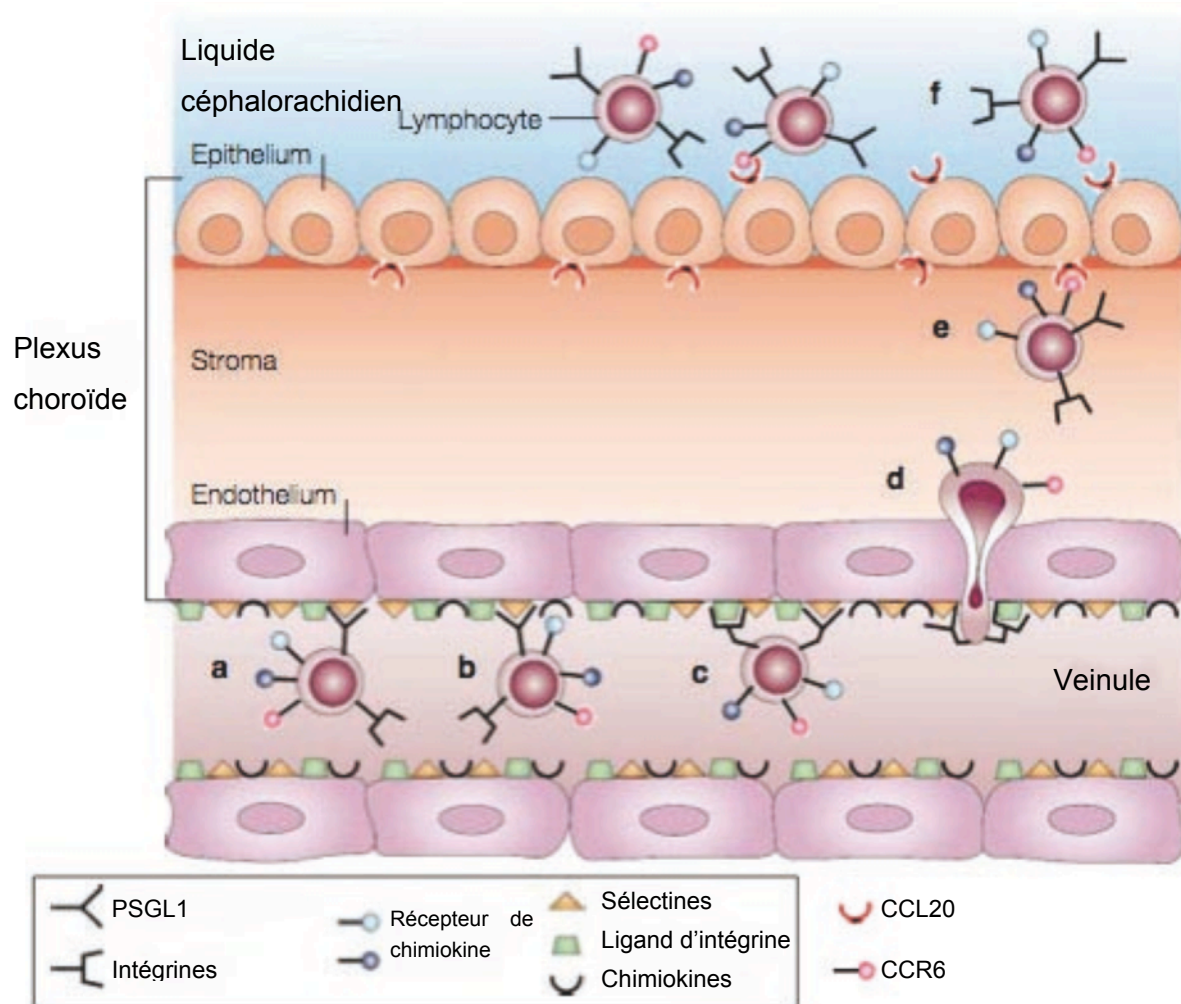
zones sous-piales et un recrutement de lymphocytes T dans les méninges dès le 7<sup>ième</sup> jour après l'immunisation (Brown and Sawchenko, 2007).

Contrairement au mécanisme décrit au niveau des vaisseaux parenchymateux, la première étape de roulement, au niveau des vaisseaux méningés du cerveau, semble s'effectuer par l'intermédiaire d'interactions entre les sélectines E et P à la surface des cellules endothéliales activées, et le ligand correspondant, PSGL1 à la surface des lymphocytes. En effet, le blocage de PSGL1, de la sélectine P ou E par un anticorps réduit de 96% l'activité de roulement des lymphocytes sur les vaisseaux piaux cérébraux de souris (Piccio et al., 2002). Les mécanismes régissant les étapes d'adhésion et de migration transendothéliale sont similaires à ceux établis dans le parenchyme, avec une implication des intégrines, LFA-1 et VLA-4 à la surface des lymphocytes avec ICAM-1 et VCAM-1 sur l'endothélium.

Le mécanisme de migration transendothéliale au niveau de la moelle épinière pourrait être différent de celui au niveau des vaisseaux cérébraux. Une étude par vidéomicroscopie montre que contrairement aux mécanismes engagés dans le cerveau, les lymphocytes T spécifiques de la myéline ne semblent pas marquer d'étape de roulement le long des vaisseaux méningés pénétrant de la moelle épinière. Les lymphocytes activés effectuent un arrêt immédiat médié par l'interaction de VLA-4 et VCAM-1 (Vajkoczy et al., 2001). Ainsi les sélectines précédemment décrites ne semblent pas nécessaires aux passages des lymphocytes. Cependant des travaux plus récents ayant un mode d'activation différent des lymphocytes T montrent également par vidéomicroscopie le roulement de lymphocytes T activés à la surface de l'endothélium (Bartholomäus et al., 2009). D'autres études sont donc nécessaires pour déterminer les réels mécanismes impliqués dans la migration des lymphocytes au niveau de la moelle épinière.

La situation anatomique des **plexus choroïdes** rend impraticable les techniques d'analyse de migration *in vivo* comme la microscopie intravitale. Les mécanismes impliqués dans la migration précoce des leucocytes au travers de la BSLCR sont mal connus, néanmoins, l'absence d'expression de VCAM par l'endothélium non activé suggère que l'interaction VLA-4/VCAM n'est pas impliquée dans l'extravasation à travers l'endothélium. Au contraire, la sélectine P peut être exprimée faiblement par l'endothélium inactif ou rapidement induite en réponse à un stimulus immun aigu. De plus, lors d'expériences de transfert adoptif, des lymphocytes T activés et rendus fluorescents, injectés chez une souris saine par voie intraveineuse sont retrouvés au bout de 2 heures dans le stroma des plexus choroïdes et dans

les espaces méningés. Ces cellules expriment constitutivement la sélectine P. Cette étude a également montré que deux types de lymphocytes exprimant plus ou moins VLA-4 migrent de la même façon au cours des deux premières heures dans le SNC, appuyant l'hypothèse d'un mécanisme autre que VLA-4/VCAM. Par contre cette observation n'est plus valable à 24 heures, ce qui suggère l'implication de VLA-4/VCAM dans des temps plus tardifs (Carrithers et al., 2000). Une autre étude met en avant la migration précoce des lymphocytes au niveau des plexus choroïdes chez des souris EAE. Reboldi *et al.* ont montré que les lymphocytes Th17 activés expriment CCR6, le récepteur de la chimiokine CCL20 exprimée constitutivement par les plexus choroïdes. De plus, des souris déficientes en CCR6 ne développent d'EAE qu'après transfert de lymphocytes Th17 CCR6<sup>+</sup>. Les cellules Th17-



**Figure 15 : Mécanismes possibles de passage des lymphocytes au travers de la BSLCR.** Les sélectines E et P / PSGL1 permettent la migration transendothéliale des lymphocytes mémoires et CCL20 permet la migration transchoroïdienne des leucocytes CCR6<sup>+</sup>. *Modifié d'après (Ransohoff et al., 2003; Reboldi et al., 2009)*

CCR6<sup>+</sup> seraient les premières cellules à pénétrer dans le SNC (Reboldi et al., 2009) (Figure 15). Ces lymphocytes pourraient alors atteindre rapidement les leptoméniges via le LCR pour rencontrer des CPA et initier une réponse inflammatoire.

La réactivation des cellules immunes par les CPA dans les compartiments liquidiens va entraîner des modifications inflammatoires des différentes structures (plexus choroïdes, méninges et vaisseaux du parenchyme). Cela conduit à l'expression de signaux de migration additionnels au niveau des différentes barrières, permettant un recrutement secondaire plus massifs de cellules inflammatoires du sang aux espaces périvasculaires et sous-arachnoïdiens.

Les différentes études décrites ci-dessus qui ont permis de détailler les mécanismes de migration des cellules immunes concernent principalement les lymphocytes T CD4<sup>+</sup>, en raison de l'utilisation fréquente d'EAE par transfert adoptif. Les données concernant les mécanismes intervenant dans la migration des autres types cellulaires dans le SNC sont très limitées, et détaillées ci-dessous.

### III.3.3 c -Les mécanismes de migration établis pour les autres types de leucocytes

Les études de la migration des autres types cellulaires au travers des deux interfaces sang-cerveau ont été basées sur l'utilisation de modèles cellulaires *in vitro* dont la plupart ne représentent que très peu les propriétés de barrières de ces interfaces. De manière générale, les molécules ICAM-1, VCAM-1, et les deux intégrines  $\beta 2$ , LFA-1 (CD11a/CD18) et Mac-1 (CD11b/CD18), semblent être impliquées dans les processus de migration de différents leucocytes. L'importance de l'implication des intégrines dans la physiopathogénèse de l'EAE a été étudiée grâce à l'utilisation d'anticorps ou de souris déficientes pour certaines intégrines. Les études révèlent des résultats très variables. L'inhibition des intégrines  $\beta 2$  résultent généralement en une diminution de la sévérité de l'EAE mais peut également conduire à une exacerbation de la maladie (Hu et al., 2010). Récemment deux études ont analysé le passage des neutrophiles au travers des modèles *in vitro* de BHE et BSLCR, dans des conditions inflammatoires différentes, c'est-à-dire après infection bactérienne ou stimulation cytokinique. Les neutrophiles migreraient préférentiellement par voie transcellulaire (von Wedel-Parlow et al., 2011). Les partenaires moléculaires ne sont pas totalement déterminés mais CD11b/CD18 semble impliqué dans ce processus (Wewer et al., 2011). De trop nombreuses variables existent dans les méthodes utilisées, ne permettant pas de définir

clairement les mécanismes de migration des neutrophiles, ou alors mettant en avant le caractère multiple/redondant de ces mécanismes.

Des études du mécanisme de migration des macrophages en conditions pathologiques, ont été réalisées dans des modèles d'infection par le virus du sida. Ces recherches montrent que la migration transendothéliale des macrophages est dépendante des sélectines E, L, de VLA-4 et des intégrines  $\beta 2$  pour les étapes de roulement des monocytes sur l'endothélium. Puis l'adhésion serait facilitée par l'expression de CCL2 et de CX3CL1 par l'endothélium ainsi que de VCAM-1. La diapédèse serait permise par la présence de PECAM et CD99. Après la migration transendothéliale, les monocytes activés sécrètent de la gélatinase B qui dégrade la matrice extracellulaire (Nottet, 1999).

Des analyses plus précises doivent cependant être réalisées concernant l'identification des partenaires moléculaires impliqués dans la migration des types cellulaires autres que les lymphocytes T à travers les interfaces sang-cerveau.



# **OBJECTIFS GENERAUX**





L'infiltration des cellules immunes dans le SNC est un élément déterminant dans l'initiation de pathologies neuro-inflammatoires, telles que la SEP. Elle est dépendante du niveau d'activation des cellules immunes circulantes, de la présence de molécules d'adhésion associées aux cellules formant les interfaces sang-cerveau, et des concentrations en composants pro- ou anti-inflammatoires présents dans le milieu extracellulaire et dans le LCR. L'EAE est le modèle animal le plus souvent utilisé pour étudier la physiopathogénèse de la SEP. Ce modèle est caractérisé par la présence d'infiltrats leucocytaires et de démyélinisation dans le SNC. L'EAE est souvent considérée comme une pathologie médiée par les lymphocytes T et touchant en particulier la moelle épinière.

Des études récentes s'accordent pour montrer que la BSLCR localisée au niveau des plexus choroïdes, constitue un site jusqu'alors sous-estimé de pénétration des cellules immunes dans le cerveau. Cette voie d'accès semble particulièrement impliquée dans la surveillance immune du cerveau, et peut-être dans la pathogénie de la SEP. Une exacerbation de l'infiltration lymphocytaire précoce dans le LCR par cette voie pourrait en particulier contribuer à la localisation préférentielle des plaques de démyélinisation focale et des zones de dégénérescence diffuse observée respectivement dans les régions périventriculaires et sous-piales dans la SEP.

Cependant, la distribution des différents effecteurs immuns, au sein des compartiments liquidiens et tissulaires des cerveaux moyen et antérieur, est encore largement inexplorée. Les mécanismes de migration leucocytaire au travers de l'épithélium choroïdien, ainsi que la capacité des plexus choroïdes à sécréter des molécules immuno-actives en réponse à un stimulus inflammatoire restent également à être caractérisés.

Notre travail de thèse s'inscrit donc dans la compréhension des mécanismes qui orchestrent l'infiltration de ces cellules, notamment ceux impliquant le système liquidien, identifié comme un acteur dans la répartition de l'inflammation dans l'EAE.

Le principal objectif de ce travail a été d'identifier la répartition précise des cellules immunes infiltrant le cerveau, au cours d'une inflammation périphérique et de l'EAE, et de rechercher la relation de ces zones d'infiltrats avec le système liquidien. En parallèle, l'identification des différents acteurs immunitaires impliqués dans cette pathologie souvent décrite comme étant à lymphocyte T a été effectuée. Une analyse spatio-temporelle de l'infiltration cérébrale des différents types de cellules immunes a été réalisée par une approche *in vivo* menée sur deux modèles murins d'EAE. Ceci nous a permis de proposer un rôle actif du LCR dans la

distribution des cellules immunes au sein du SNC et de montrer la multiplicité des effecteurs intervenant dans l'initiation de cette pathologie.

Le second objectif a été de contribuer à l'identification des mécanismes qui contrôlent le trafic des cellules spécifiquement au travers de l'interface sang-LCR. En effet, les données de la littérature ainsi que nos premiers travaux désignent les plexus choroïdes comme une voie d'entrée possible des cellules immunes dans le cerveau. Nous nous sommes donc focalisés sur les partenaires moléculaires qui interviennent dans le passage des cellules immunes du sang vers le SNC. Nous avons choisi de mener une étude comparative de l'expression des ANRm codant pour des molécules d'adhésion, des cytokines, des chimiokines et de leurs récepteurs présents au niveau des deux interfaces sang-cerveau, la BHE et la BSLCR, afin de caractériser les spécificités de cette dernière.

Le dernier objectif a été d'identifier les plexus choroïdes comme source potentielle de molécules immuno-actives. Des chimiokines ont été retrouvées dans le LCR des rats EAE de notre première étude. Nous avons également montré dans notre deuxième étude que des transcripts de chimiokines sont exprimés constitutivement par les plexus choroïdes. Ces données suggèrent que l'interface sang-LCR sécrète des molécules favorisant la distribution des cellules immunes au cours de pathologies. Pour explorer cette hypothèse, nous avons comparé le profil de chimiokines sécrétées au pôle apical des cellules épithéliales choroïdiennes formant la BSLCR *in vitro*, au profil de chimiokines retrouvées *in vivo* dans le LCR de rat. Les profils de sécrétion ont été analysés *in vivo* et *in vitro* dans des conditions normales ou après une stimulation cytokinique par de l'IL-1 $\beta$ .

# RESULTATS



## **Influence des compartiments liquidiens dans l'infiltration cérébrale des leucocytes au cours de l'inflammation périphérique et de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale**

L'EAE est la maladie inflammatoire du système nerveux central la plus couramment utilisée comme modèle d'étude de la SEP. Les différentes études visant à comprendre les mécanismes d'entrée des cellules immunes dans le SNC au cours de l'EAE, ont porté principalement sur l'interaction des lymphocytes T avec l'endothélium des vaisseaux cérébraux activés. Cependant, le LCR a été considéré comme un système de circulation préférentiel des cellules immunes au cours de la surveillance neuro-immunitaire chez l'homme. Des études récentes s'accordent pour montrer que la BSLCR, localisée au niveau des plexus choroïdes, constitue un site jusqu'alors sous-estimé de pénétration des cellules immunes dans le cerveau. L'implication du système de circulation du LCR dans la pathogénie de la SEP pourrait expliquer la localisation préférentielle des plaques de démyélinisation dans les zones périventriculaires et les zones de dégénérescence sous-piales. La circulation du LCR est plus complexe qu'habituellement reconnue. Produit par les plexus choroïdes localisés dans les ventricules, le LCR circule rapidement au travers du système ventriculaire, puis plus lentement au travers du réseau de citernes et velums internes avant d'atteindre les espaces sous-arachnoïdiens entourant le SNC.

Afin d'évaluer l'implication des espaces liquidiens dans l'infiltration des cellules immunes au cours de l'EAE, nous avons réalisé une analyse spatio-temporelle de l'association des cellules infiltrantes avec les compartiments liquidiens ventriculaires et extraventriculaires dans deux modèles animaux. Les résultats identifient certains velums et citernes du cerveau antérieur comme des sites préférentiels d'infiltration des cellules immunes après une inflammation périphérique et dans les phases précoces d'une inflammation centrale. Ces données sont retrouvées dans les deux modèles, malgré une localisation différente des infiltrats au sein du parenchyme cérébral. Les résultats confortent l'hypothèse d'une voie d'entrée des cellules par les plexus choroïdes et les vaisseaux présents dans ces espaces dans les phases précoces de la pathologie. Ils mettent également en exergue l'implication d'effecteurs multiples dans l'initiation de l'EAE.

Ces données définissent le rôle du LCR dans la distribution des cellules immunes au cours de l'EAE. Elles sont présentées ci-après, sous forme d'un article actuellement soumis pour publication.

**Brain leukocyte infiltration initiated by peripheral inflammation or EAE occurs through pathways connected to the CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain.**

Charlotte Schmitt<sup>1</sup>, Nathalie Strazielle<sup>1,2</sup>, Jean-François Gherzi-Egea<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Inserm U1028, Lyon Neuroscience Research Center, Neurooncology & Neuroinflammation Team, Lyon, F-69000, France.

<sup>2</sup> Brain-i, Lyon, France

Corresponding author:

Jean-François Gherzi-Egea, PharmD, PhD, INSERM U1028, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Equipe J.Honnorat, Faculté de Médecine Laënnec, 7 rue G. Paradin, 69372 LYON cedex 08, France

E-mail: [jean-francois.ghersi-egea@inserm.fr](mailto:jean-francois.ghersi-egea@inserm.fr)

Tel: +33 478778792

**Abstract**

The cerebrospinal fluid (CSF) has been considered as a preferential pathway of circulation for immune cells during neuroimmune surveillance. In order to evaluate the involvement of CSF-filled spaces in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a model of multiple sclerosis, we performed a time course analysis of immune cell association with the CSF-containing ventricles, velae, and cisterns in two active models of this disease. Freund's adjuvant-induced peripheral inflammation in absence of brain antigen led to a subtle but definite increase in the number of myeloid cells in the extraventricular CSF spaces. Both guinea-pig spinal cord homogenate-induced EAE in rat and MOG-induced EAE in mouse were characterized by a sustained and initial infiltration of lymphocytes and monocytes within forebrain/midbrain fluid-filled compartments such as the velum interpositum, the ambient cisterns and selected basal cisterns. Leukocytes further infiltrated periventricular and pericisternal parenchymal areas, along perivascular spaces or following a downward CSF-to-tissue gradient. Cells, quantified in CSF sampled from rats, included lymphocytes and neutrophils. Data in favour of both the choroid plexus and the vessels lying in the velae and cisterns being gates for early leukocyte entry in the CNS were gathered. B-cell infiltration observed in the mouse model was restricted to CSF-filled extraventricular compartments.



Overall these results identified selected velae and cisterns of the forebrain and midbrain as preferential sites of immune cell homing following peripheral and early central inflammation and pointed to a role of CSF in directing brain invasion of immune cells during EAE.

Keywords: brain cisterns, choroid plexus, macrophage, multiple sclerosis, neuroinflammation, ventricle

## INTRODUCTION

Intact blood-brain and blood-cerebrospinal fluid barriers (BBB and BCSFB, respectively), located at the endothelium of the brain microvessels and the epithelium of the choroid plexuses (CP), are essential to central nervous system (CNS) homeostasis. In multiple sclerosis (MS), an inflammatory disease of the CNS leading to demyelination and neurodegeneration, circulating leukocytes cross the brain barriers to gain access to the CNS. Experimental autoimmune encephalomyelitis induced by immunization with myelin proteins or peptides, or with whole spinal cord homogenates, is commonly used as an experimental model of MS to study the pathophysiology of this disease or to evaluate the efficacy of new therapeutic strategies. EAE is characterized by intermittent periods of progressive weakness or paralysis, concomitant to episodes of leukocyte infiltration and demyelination in the CNS [3, 21].

Studies of the mechanisms underlying the entry of immune cells into the CNS in the course of EAE have largely focused on the interactions between activated T lymphocytes and the inflamed cerebral endothelium. They pointed out the role of VLA-4/VCAM-1 interactions at the sites of leukocyte infiltration in the disease progression [11, 17]. However, in the early stages of inflammation, the primary events triggering the migration of immune cells across non inflamed CNS barriers the actual sites of immune cell entry into the brain, and the pathways of cell trafficking within the brain, are not fully elucidated.

During physiological immune surveillance of the CNS, the CSF has been proposed to constitute in human a predominant route for T-cell trafficking to and from the CNS [9, 15]. In MS, the involvement of CSF in immune cell infiltration is suggested by the predominant localization of focal demyelinated plaques and diffuse white matter injury in periventricular and subpial areas, respectively [1, 20]. Similarly, in murine EAE a spatiotemporal analysis of the pathogenesis of the disease indicated that periventricular and superficial white matter structures are primary targets of early T-cell infiltration [5]. Based on the constitutive expression of P-selectin and the chemokine CCL20 in CP, the BCSFB has been pointed out as a direct route of lymphocyte migration from the blood into the brain, accounting for the lack of permissivity of the resting brain endothelium to immune cell migration during neuroinflammation initiation [19, 33, 34]. Other studies rather proposed that the vessels running in subarachnoid spaces of the lower part of the spinal cord were the initial site of T-cell entry into the CSF in rat during EAE, implying that EAE is primarily a spinal cord disease [2].

The underestimated complexity of CSF circulation needs to be taken into account to fully understand immune cell traffic into the brain. This fluid is produced by the CPs in both lateral, in the third and the fourth ventricle. It flows briskly through the ventricular system and more slowly through a network of velae as well as internal and ventral cisterns present in both rodent and human, before reaching the external subarachnoid spaces surrounding the brain. There, it partially mixes with the CSF filling the meningeal spaces of the spinal cord. A large part of CSF is contained in the cisterns of the forebrain and midbrain, which connect to the third and mesencephalic ventricles via the different velae [13, 14].

In this paper we seek to evaluate the role of this complex CSF network in the dissemination of different types of immune cells within the brain, and to probe into the respective involvement of various potential anatomical sites of cell entry into the CNS during the early phases of EAE. We established the spatiotemporal cerebral distribution of T-, B-lymphocytes, monocytes and neutrophils. Two different models of EAE were analyzed to account for potential model-to-model variation in immune cell trafficking. We show in both models the systematic implication of CSF-filled spaces of the forebrain and midbrain in the initial distribution of immune cells in the CNS.

## MATERIAL AND METHODS

### *Animals*

A total of 93 female Dark Agouti (DA) rats (130-140 g) and 30 female C57BL/6J mice (8 week-old) were purchased from Janvier (Saint Genest sur Isle, France) and Charles River (Saint Germain sur l'Arbresle, France) respectively. They were maintained on a 12:12 hour light/dark cycle. All animal research was conducted according to the French Ethical Committee guidelines (decree 87 to 848) and the European Community directive 86 to 609-EEC.

### *Induction of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis*

EAE was induced in isoflurane-anesthetized DA rats by intraplantar injection of guinea-pig spinal cord homogenate (830 µg/paw), emulsified at 4°C in 100 µl of complete Freund's adjuvant (CFA; Difco, Detroit, MI) supplemented with 250 µg *Mycobacterium tuberculosis* (Difco). EAE was induced in isoflurane-anesthetised C57BL/6J mice by injecting each flank subcutaneously with 50 µg of MOG<sub>35-55</sub> (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; GeneCust,

Luxembourg) in 100 µl CFA. In mice, *Bordetella pertussis* toxin (200 ng in 100 µl; Sigma, Saint Louis, MO) was injected intravenously on the day of initial vaccination and 2 days later. Animals were monitored daily, weighed, and the clinical score (CS) was determined as follows: CS1, tail weakness; CS2, tail paralysis; CS3, hindlimb weakness; CS4, hindlimb paralysis. When clinical signs were graded as intermediate between two scores, 0.5 was added to the lower value. Sham animals were injected following the same protocol as for EAE-diseased animals but the brain antigen was omitted. They were considered as animals suffering from a peripheral inflammation only. On post-vaccination day 2, 4, 6, 9 (onset of the disease) and 11 (peak of the disease), rats were either sacrificed by decapitation following light anaesthesia or perfused with 10 ml of 0.9% NaCl under i.p. pentobarbital anaesthesia. Mice were anesthetized with an i.p injection of pentobarbital on day 1, 8, 11 (onset of the disease) and 13 (peak of the disease), and were perfused with 5 ml of 0.9% NaCl. In all cases, brains were removed, immediately frozen in -40°C isopentane and stored at -80°C for immunohistochemistry.

### ***CSF and blood sampling in rats***

CSF was sampled from additional control, sham and EAE-diseased rats under isoflurane anaesthesia as follows: the head positioned in a stereotaxic frame was tilted downward to expose the neck. Following skin incision, muscles were gently removed to display/uncover the cisterna magna. A dental needle (30 G) fixed to a holder and connected to a tubing was approached parallel to the bregma/lambda axis to collect the CSF through the cisterna magna. A minimum of 50 µl of CSF was sampled free of blood contamination and stored at -80°C until chemokine analysis was performed. The collection tubing was precoated with Phosphate Saline Buffer (PBS) containing 0.1 % bovine serum albumin (BSA), and 5 µl of the PBS-BSA solution was left inside to flush the collected CSF. CSF was then centrifuged for 10 minutes at 800 g at 4°C. Most of the CSF was then removed and kept at -80°C for chemokine analysis. The remaining 10 µl of CSF containing the cells was spread on a slide and left to dry at 37°C, prior to acetone/methanol (1/1) fixation for 2 minutes at room temperature. Slides were stored at -20°C until immunocytochemistry analysis. Samples containing red blood cells (RBC) were discarded from the analysis.

Following CSF sampling, animals were sacrificed and blood was collected in heparinised tubes. 200 µl of blood underwent RBC lysis in an ammonium chloride potassium buffer (150mM NH<sub>4</sub>Cl, 10mM KHCO<sub>3</sub>, 0.1mM Na<sub>2</sub>EDTA, pH 7.4) for 5 minutes. Samples were diluted with PBS, centrifuged at 400 g for 5 min, and drops of resuspended leukocytes were

left to dry on slides prior to fixation in acetone/methanol for 2 minutes and stored at -20°C for immunocytochemistry.

### ***Chemokine analysis in CSF***

CXCL10 (IP-10), CCL2 (MCP-1), CCL3 (MIP-1 $\alpha$ ) and CCL5 (RANTES) were quantified using the MILLIPLEX MAP Rat Cytokine/Chemokine Panel (Millipore, St Charles, MI, USA), according to the manufacturer's instructions. The plate was analysed on a Bio-Plex 100 (BioRad, Hercules, CA, USA). The concentration of CXCL1 was measured by ELISA using the Quantikine Rat CINC-1 Immunoassay kit from R&D Systems.

### ***Immunohistochemistry and immunocytochemistry***

7  $\mu$ m-thick sections of rat and mouse frozen brain were cut from areas selected to allow an extensive analysis of immune cells in the ventricular and extraventricular CSF-containing compartments, within the cell layers bordering these compartments, and in the adjacent neural structures. The ventricular compartments included, in a rostro-caudal order and following the flow of CSF, the anterior and posterior horns of the lateral ventricle, the dorsal and ventral part of the third ventricle, the aqueduct and mesencephalic ventricle, and the central part and lateral recesses of the fourth ventricle. The internal extraventricular compartments included the velum interpositum abutting the dorsal part of the third ventricle and pineal recess, the quadrigeminal and ambient cisterns separating the midbrain from the cortices, the superior medullary velum abutting the mesencephalic ventricle and the ventrolateral cerebellar meninges. The more external extraventricular compartments included, at the base of the brain and in a caudo-rostral order, the interpeduncular fossa, the cistern of the optic tract and the cistern of the laminae terminalis, and finally the rhinal fissure at the surface of the cortex. The thin layer of meninges at the base of the brain and at the surface of the cortex and cerebellum were also examined when they remained adherent to the extracted brains. The respective location of these different spaces is highlighted in Electronic Supplementary data S1. Frozen brain sections were dried at room temperature, fixed in acetone/methanol for 5 minutes or in ethanol for 10 minutes for rat or mouse, respectively. These fixation procedures were found optimal for the antibodies used in each species.

Fixed brain section and cells isolated from blood or CSF were blocked for 1 hour at room temperature in PBS supplemented with 0.2% BSA, 0.8% normal goat serum, and for CD45 antibody with 0.2% Triton X-100). Immune cells were detected and characterized in rat using mouse monoclonal antibodies against CD45 (cat. 550556 - 0.625  $\mu$ g/ml), CD45RA (cat.

554882 - 2.5 µg/ml), all from BD Pharmingen (Le Pont de Claix, France), CD68 (cat. MCA341R - 1.25 µg/ml) from AbD Serotec (Colmar, France) and rabbit anti-CD3 (cat. ab5690 - 1 µg/ml) from Abcam (Cambridge, UK). In mouse, rat monoclonal antibodies against CD3 (cat. 555273 - 1.6 µg/ml), CD45R/B220 (cat. 01121D - 1.6 µg/ml) from BD Pharmingen and CD68 (cat. MCA1957 - 1.25 µg/ml) from AbD Serotec were used on mouse tissue sections. A rabbit polyclonal antibody anti-MPO (cat. A0398 - 1 µg/ml) (Dako, Glostrup, Germany) was used in double staining with CD68 in both species. Sections and cells were incubated with the primary antibodies overnight at 4°C in blocking buffer, then rinsed 4 times in PBS. The sections and cells were incubated with secondary Alexa Fluor-conjugated goat anti-mouse, -rat or -rabbit antibodies (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) for 1 hour at room temperature. In some experiments, double labelling with laminin (cat. 24851 - 12.5 µg/m, (Novotec, St Martin La Garenne, France) was performed to evaluate whether immune cells associate with the vessels. Nuclei were stained with 0.1 µg/ml DAPI (Roche Diagnostics, Mannheim, Germany) for 5 minutes. Images were acquired under epifluorescence illumination (at 488 and 555 nm) on an AxioVision microscope (Zeiss, Jena, Germany). The number of immune cells in blood and CSF was expressed as a percentage of immunolabelled cells relative to the total number of cells assessed by DAPI.

### ***Immune cell quantification in choroid plexuses***

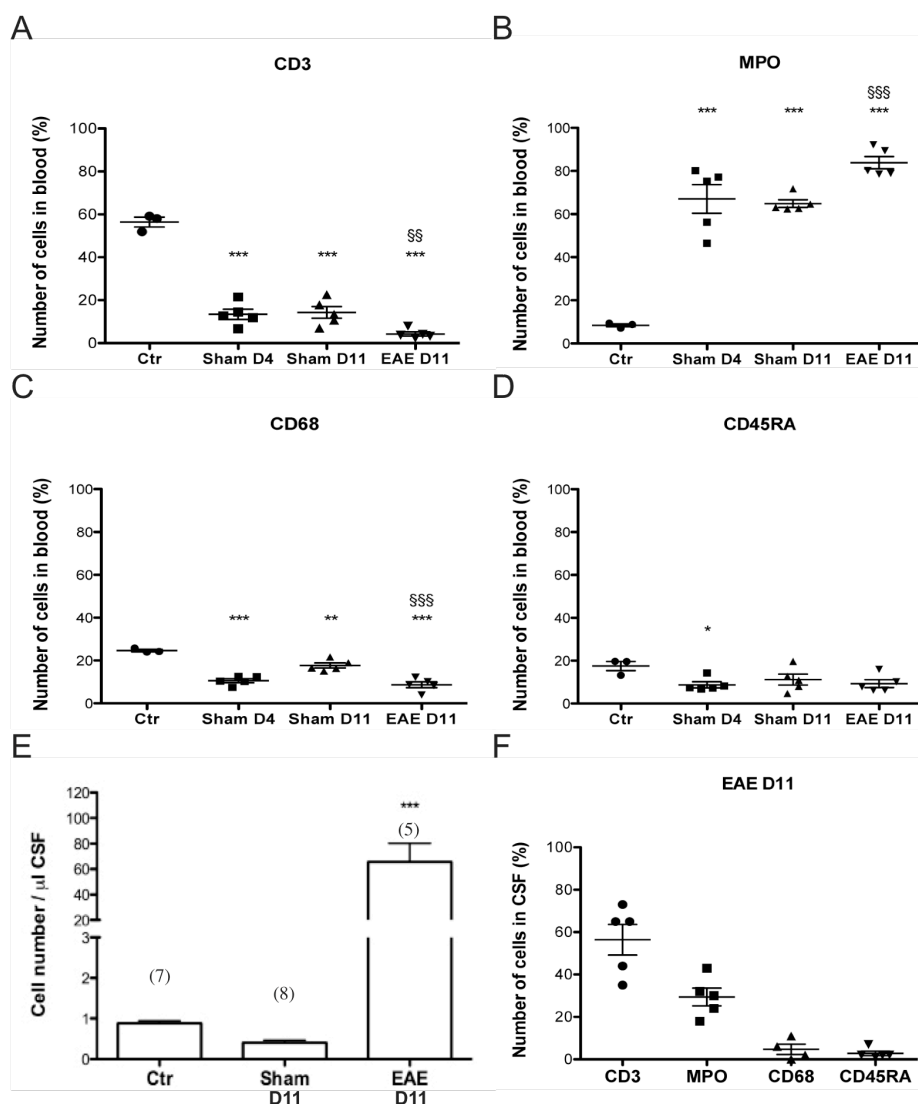
Rat CD45<sup>+</sup> cells and mouse CD3<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup> cells were quantified in both the lateral and fourth ventricle CP as a percentage of immune cells relative to the total number of cells in the choroidal tissue as follows. Four brain sections were analyzed for each CP. Two sections were selected 50 µm apart around bregma -3.3 mm and two other around bregma -3.8 mm at the level of the lateral ventricle, or at bregma -11.5 mm and bregma -12 mm at the level of the fourth ventricle. CPs were manually delimited on the micrographs and the total number of cells (based on DAPI staining) and that of immune cells was quantified using the software ImageJ.

## **RESULTS**

### ***Clinical and biological courses of control, sham and EAE-diseased animals***

Four independent EAE inductions in rat and 2 independent EAE inductions in mouse were realized for this study. In rat, both sham and EAE-diseased animals displayed a sustained paw

inflammation throughout the experimental period. The first clinical sign was a weight loss on D1 post-injection, visible in both EAE and sham animals compared with control rats. This loss lasted throughout the first week post-treatment and was more marked in sham than in EAE-diseased animals (Supplementary data S2A). From day 9, only the latter continued to



**Figure 1:** Phenotype of the leukocytes present in blood and CSF of control, sham and EAE-diseased rats

A-D. Immunocytochemical identification of blood leukocytes. The percentages of CD3<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup> and to some extent CD45RA<sup>+</sup> cells decrease, while the percentage of MPO<sup>+</sup> cells increases strongly in both sham and EAE animals in comparison with the control group (Ctr), (Dunnett's test, \* p<0.05, \*\* p<0.01, \*\*\* p<0.001). The percentage of MPO<sup>+</sup>, CD3<sup>+</sup>, and CD68<sup>+</sup> cells in the blood of sham animals and of animals with EAE at day 11 is also statistically different. One-tailed t-test for unequal variance, §§ p<0.01, §§§ p<0.001. E. Few cells are present in the CSF of control and sham rats. The number of cells increases significantly in the CSF of EAE animals. Dunnett's test, p<0.001 (\*\*\*). F. The main population of cell in the CSF of EAE rats is CD3<sup>+</sup> and a significant proportion of MPO<sup>+</sup> cells is also present. In A-D and F, the percentage of leukocytes that were CD3<sup>+</sup>, MPO<sup>+</sup>, CD68<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup> cells, are given for individual animals, and the mean  $\pm$  SEM is shown. In E, data are expressed as mean  $\pm$  SEM, (n).

lose more weight, concurrently to the occurrence of the clinical disease (see Supplementary data S2B for more details). In mice, a similar tendency for sham animals to lose more weight than EAE-diseased animals during the first 8 days was also observed, but the smaller number of animals did not allow a statistical analysis. Neurological signs in EAE-diseased mice were first observed on D8. The peak of the disease lasted for a longer period than in rat, i.e. between D11 and D16, and was also accompanied by a marked weight loss (not shown).

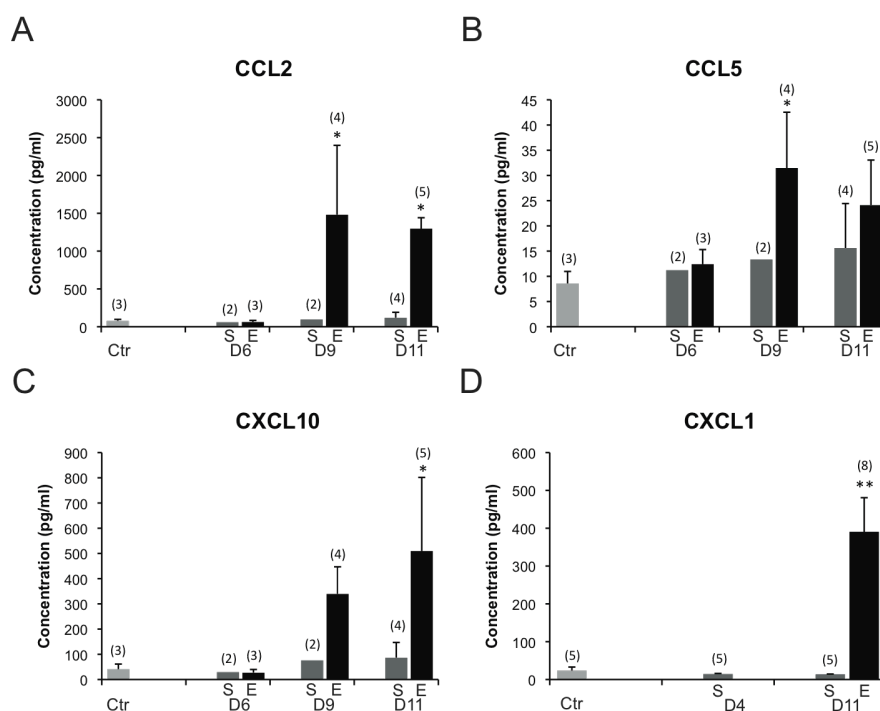
T cells identified as CD3<sup>+</sup> cells amounted to 60 % of total leukocytes in the blood of control rats (Figure 1A), while MPO<sup>+</sup>/CD68<sup>-</sup> neutrophils represented less than 10 % of leukocytes (Figure 1B). In the blood of sham and EAE-diseased animals, the ratio of CD3<sup>+</sup> cells over MPO<sup>+</sup> cells was reversed with neutrophils amounting to 60 % of total leukocytes, both early after induction and at the peak of EAE (Figure 1A,B). CD68<sup>+</sup> and CD45RA<sup>+</sup> cell counts revealed respectively a significant decrease in the proportion of monocytes in the blood of sham and EAE-diseased animals and of B cells in the blood of sham animals sacrificed on D4, as compared with control animals (Figure 1C,D).

Cell counts in CSF were very low in both control and sham animals (fewer than 1 cell/ $\mu$ l CSF), and strongly increased in EAE-diseased animals during the clinical phase of the disease (Figure 1E). In all groups, at least 95% of these cells were CD45<sup>+</sup> positive. In control and sham animals CSF leukocytes were almost exclusively CD3<sup>+</sup> cells (data not shown). In EAE-diseased animals, CSF-borne cells comprised 30 % of MPO<sup>+</sup> neutrophils, and a few percent of CD45RA<sup>+</sup> B cells and CD68<sup>+</sup> monocytes in addition to the CD3<sup>+</sup> cells (Figure 1F). Among the 5 chemokines analyzed in CSF, CCL2, CCL5, CXCL10 and CXCL1 were detected in control animals, indicating these chemoattractants circulate in this fluid in physiological conditions. The concentration of all 4 chemokines was unchanged in sham rats but largely increased in animals with neurological signs of EAE (Figure 2).

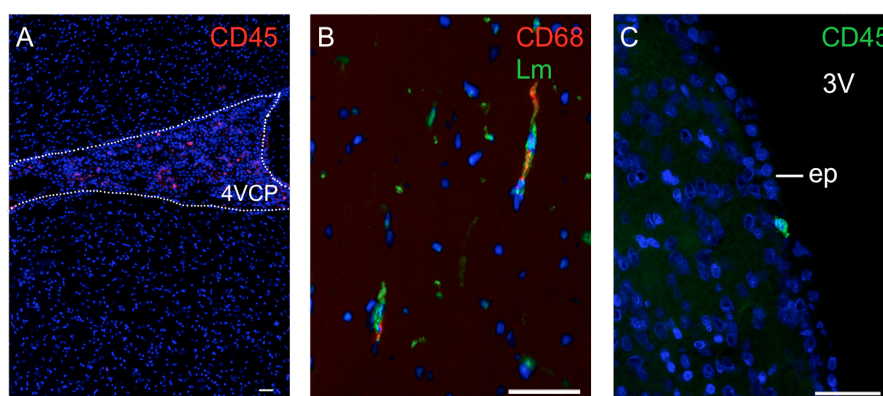
### ***Distribution and phenotypic analysis of immune cells in the brain of control, sham and EAE-diseased rats***

Only a limited number of CD45<sup>+</sup> cells could be detected in the brain of control rats. The highest density of these cells were found in the CPs of all lateral, third and fourth ventricles (Figure 3A), and the majority of them was CD68 positive. Immune cells, mainly CD68<sup>+</sup> cells, were also preferentially located in the velum interpositum and the ambient cisterns, as well as externally in the basal cisterns, basal meninges and meninges forming the largest cerebellar infoldings (e.g. Figure 5A, anatomical location shown in supplementary data S1). Very few CD68<sup>+</sup> cells were present in the brain parenchyma. Double-staining with an anti-laminin





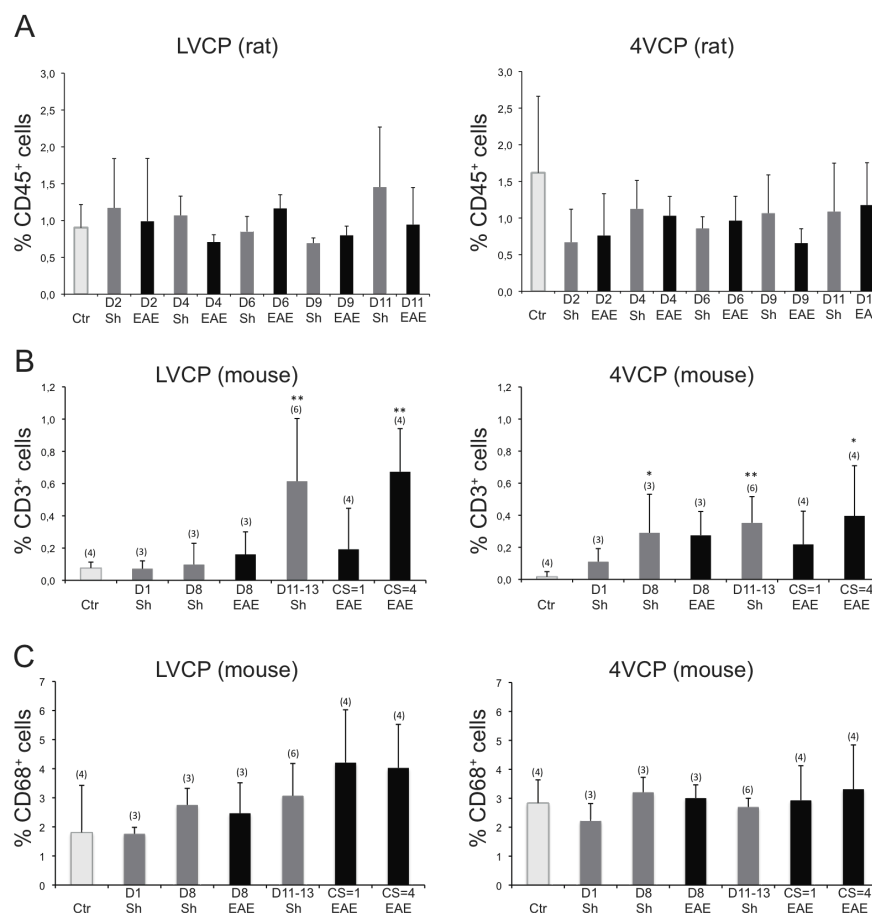
**Figure 2:** Chemokine quantification in the CSF of control, sham and EAE-diseased rats. Chemokines were analyzed by Luminex technology (A-C) or by ELISA (D). CCL2 (A), CCL5 (B), CXCL10 (C) and CXCL1 (D) were constitutively detected in the CSF of control animals. Their levels did not change in sham rats, but increased significantly when the first clinical signs appeared in EAE animals. Data are expressed as mean  $\pm$  SEM, (n). Ctr: Control, S: Sham, E: EAE, D4-D6-D9-D11: day 4-6-9-11. \* $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.01$ , statistically different from value in control animals, Dunnett's test.



**Figure 3:** Immune cell localization in parenchymal and ventricular compartments in control rat brain. A. Leukocytes are preferentially associated with the CPs (illustrated here in the 4<sup>th</sup> ventricle). B. In the brain parenchyma leukocytes are CD68<sup>+</sup> cells associated with perivascular spaces. Blood vessels are visualized by laminin. C. Occasional cells not associated with blood vessels are seen in a subependymal location. Scale bar, 50  $\mu$ m. 3V: third ventricle; ep: ependyma; Lm: laminin.

antibody that labels the basal membrane of the microvasculature [12] showed that throughout the brain these cells were associated with microvessels (Figure 3B). Their number was only partially decreased in animals perfused with physiological saline prior to brain sampling, which identifies these remaining cells as resident perivascular cells. Perfusion did not change the localization pattern of immune cells in CPs or cisternal spaces, with the exception that it cleared them from the lumen of large vessels, confirming a similar resident phenotype for the cells within these spaces. Finally, a limited number of cells (2-3 per section), that did not associate with laminin were found in the neural tissue in close proximity to the velum interpositum, to the ependyma that borders the lateral and third ventricles (Figure 3C), or to the border of the lateral recesses of the fourth ventricle.

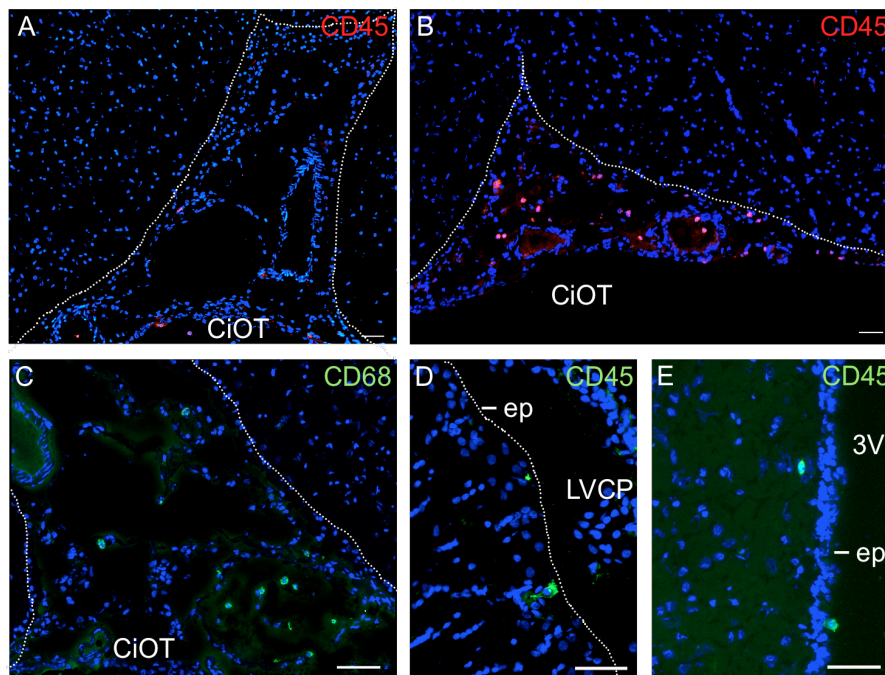
In sham animals, the number of cells present in the brain remained low, but subtle changes



**Figure 4:** Quantification of immune cells associated with choroid plexuses in control, sham and EAE-diseased rats

A. CD45<sup>+</sup> cells associated with lateral (left panel) and fourth (right panel) CP in rat. Data represent mean  $\pm$  SD, with n=3. B-C. CD3<sup>+</sup> and CD68<sup>+</sup> cells associated with lateral (left panels) and fourth (right panels) CP in mice, respectively. Ctr: Control, Sh: Sham, CS=1: clinical score of 1, CS=4: clinical score of 4, (n). \*p < 0.05; \*\*p < 0.01, statistically different from value in control animals, Dunnett's test.

could be observed in several CSF-containing spaces as compared with control animals. While the number of CD45<sup>+</sup> cells remained steady in the CPs (Figure 4A), it progressively increased from D2 up to D11 in the velum interpositum, the quadrigeminal cistern, ambient cisterns and cisterns of the optic tracts, in more than half of the sham animals (Figure 5A,B). This observation did not extend to the more rostral cistern of the laminae terminalis, the lateral rhinal fissure, or else the more caudal superior medullary velum and adjacent ventrolateral cerebellar meninges. The phenotypic analysis of the cells present in the velum interpositum and ambient cisterns of perfused sham animals at D6 and D11 showed a majority of CD68<sup>+</sup> cells (Figure 5C), juxtaposed with a small proportion of MPO<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells (data not shown). As in control rats, a few immune cells were observed with an ependymal/subependymal localization at the level of the lateral, third and fourth ventricle (Figure 5D,E). Brain parenchymal regions, including the cortex, hippocampus, hypothalamus and areas more prone to leukocyte infiltration during EAE (see below), seldom contained immune cells and were not different from those observed in control animals. Finally, some circumventricular organs, considered as possible sites of immune cell entry in the CNS [37],



**Figure 5:** Cisternal and subependymal localization of immune cells in the brain of sham rats

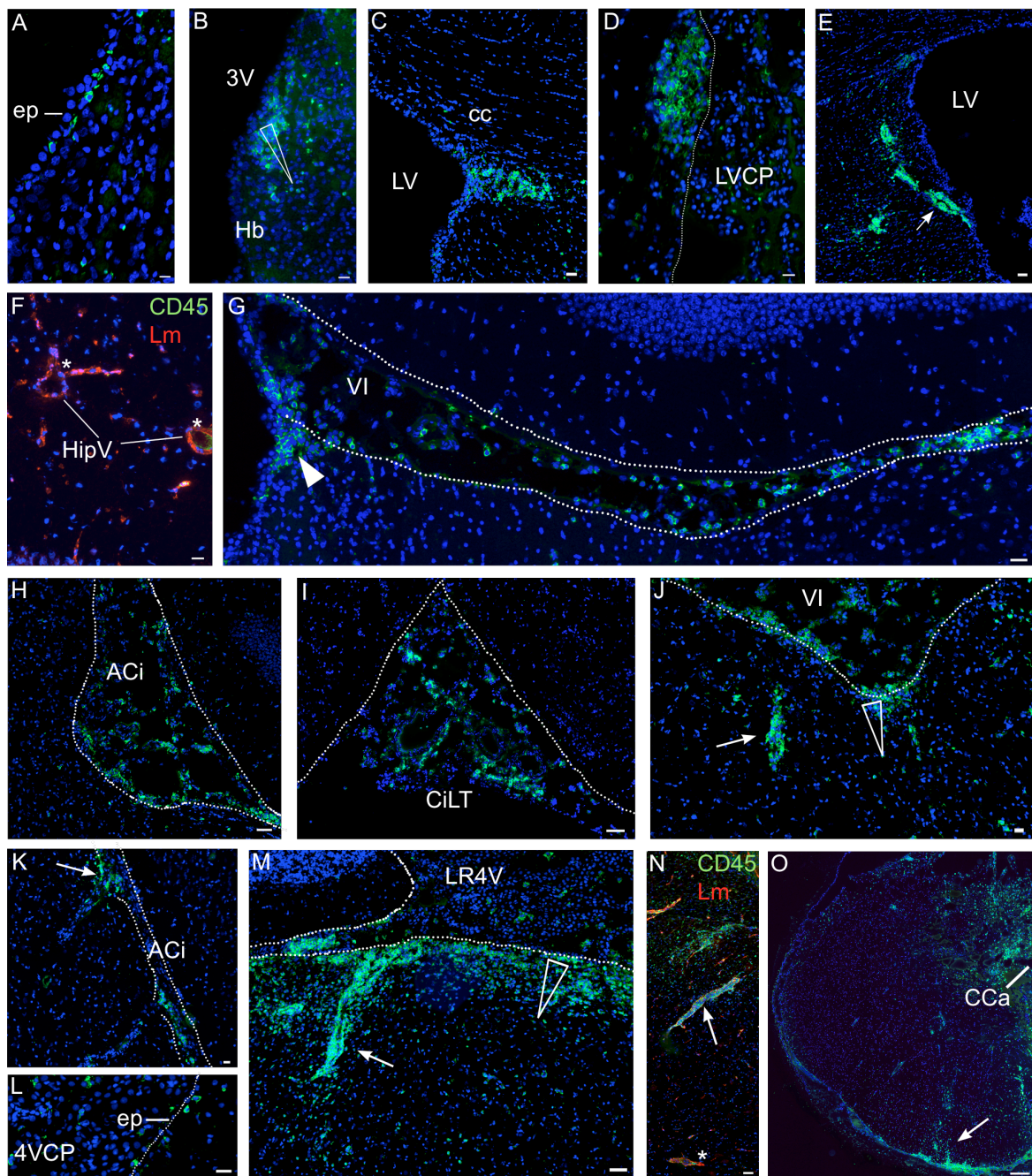
A-C. The number of cisternal immune cells increases in sham rats (B, illustrated by the optic tract cistern at D11) in comparison to control (A) animals. Most of these cells are CD68<sup>+</sup> (C). D,E. In sham rats, leukocytes are also observed in a subependymal position. CD45<sup>+</sup> cells at the level of the lateral (D) and third (E) ventricles are shown. Scale bar, 50  $\mu$ m. Dashed lines delimit cisterns (A,B,C) or ventricles (D,E). 3V: third ventricle; CiOT: cistern of the optic tract; ep: ependyma; LVCP: lateral ventricle choroid plexus.

contained only occasional leukocytes. These were mostly CD68<sup>+</sup> cells, and were observed in the subfornical organ, the median eminence and the area postrema in both sham and control animals.

During EAE, from D2 to D6 post-treatment, immune cell distribution in the velae and cisterns of the brain was similar to that observed in the brain of sham rats (data not shown). When clinical neurological signs became apparent, various drastic changes in cell distribution were observed, with the notable exception of the CPs where the number of associated leukocytes did not vary throughout the post-induction period (Figure 4A). In the forebrain and midbrain a few leukocytes were observed at D9 within the lateral ventricles, and more occasionally in the ventral part of the third ventricle and the aqueduct (not shown). Individual or small clusters of cells were observed more frequently in an ependymal/subependymal position along the lateral and third ventricles, suggesting that these leukocytes originate from the CSF (Figure 6A). The periventricular habenula (Figure 6B) and the fimbria were already infiltrated in some animals. At D11 clusters of immune cells were observed in most animals in the upper corner of the lateral ventricle anterior horn ventrally to the corpus callosum (Figure 6C). Leukocyte infiltrates were also observed in periventricular structures such as the hippocampal alveus bordering the lateral ventricle (Figure 6D), the fimbria/stria terminalis area, the thalamus ventral to the anterior horn of the lateral ventricle, the region between the dorsal and ventral part of the third ventricle, and most typically the habenula (e.g. Figure 7C). Cells either formed penetrating clusters adjacent to perivascular spaces (Figure 6E, arrow), or disseminated into the tissue following a downward density gradient from the ventricular compartment (Figure 6B, arrowhead). No cell was observed in deeper brain structures, even when obvious large perivascular spaces were present, such as along the hippocampal fissure (Figure 6F). Cell clusters were often present at the interface between the dorsal part of the third ventricle and the velum interpositum (Figure 6G, arrowhead).

Prominent infiltrates were also observed in extraventricular CSF-filled pockets and adjacent structures in EAE-diseased animals. From D9, CD45<sup>+</sup> cells in the velum interpositum, quadrigeminal and ambient cisterns, and optic tract cisterns were in larger numbers in comparison with sham animals, sometimes distributing as small clusters, but never forming clear perivascular cuffs around cisternal vessels. At D9, the number of cells in these spaces was not dependent on the clinical score of the animals. At the peak of the disease (D11, Figure 6G,H), immune cell invasion in these extraventricular CSF spaces increased even further, and extended both rostrally to the cistern of the laminae terminalis (Figure 6I) and adjacent meninges, and caudally to the interpeduncular fossa and surrounding ventral





**Figure 6:** Distinctive localization of immune cells in the CNS of EAE-diseased rats  
A-K. CD45<sup>+</sup> cells in the forebrain. L-O CD45<sup>+</sup> cells in the hindbrain. A. CD45<sup>+</sup> cells are visualized in a subependymal location at D9. B (D9), C-F and L-N (D11). CD45<sup>+</sup> cells are observed in selected periventricular areas. Cells often infiltrate the tissue as clusters in the habenula (B), ventrally to the corpus callosum (C), in the hippocampal alveus close to the lateral ventricle (D), in the pons along the fourth ventricle (L) and its recesses (M). Cells infiltrate the tissue in a disseminated manner following a downward density gradient from the CSF to the parenchyma (B,M, arrowheads) or along perivascular spaces close to the ventricle, e.g in the fimbriae (E), and in the fourth ventricle (M,N, arrows). There are no cells associated with vessels in deeper structures such as in the hippocampal fissure (star in F) and the pons (star in N). Laminin (Lm) stains the basal membrane of the vessels. In N the upper side of the image is facing CSF; the lower side is deep medular tissue. G-K: By D11, the number of leukocytes has increased in extraventricular CSF-containing internal compartments such as the velum interpositum (G, J), ambient cisterns (H, K) and also in more peripheral cisterns such as the cistern of the laminae terminalis (I).

**Figure 6 (suite):** Some infiltrates are localized between the third ventricle and the velum interpositum (G, white arrowhead). Cell infiltrates displaying a downward CSF to tissue density gradient are found ventrally to the velum interpositum (arrowhead in J) or along perivascular spaces adjacent to extraventricular CSF-filled compartments (J, K, arrows). O: In spinal cord leukocytes massively infiltrate the meninges and adjacent perivascular spaces (arrow). They also disseminate in the parenchyma, dorsally to the central canal. Scale bar, 20  $\mu$ m (A-L), 50  $\mu$ m (M-O). Dashed lines delimit ventricles (C, M) or cisterns (G-K). 4VCP: fourth ventricle choroid plexus; ACi: ambient cistern; cc: corpus callosum; CCa: central canal; CiLT: cistern of the laminae terminalis; ep: ependyma; Hb: habenula; HV: hippocampal vessels; LV: lateral ventricle; LVCP: lateral ventricle choroid plexus; VI: velum interpositum.

meninges. It did not however extend up to the rhinal fissure, the cortical meninges or the superior medullary velum. Cells often accumulated along the glia limitans, a thick layer that borders the midbrain structures facing the quadrigeminal and ambient cisterns [13]. From these latter CSF-filled compartments, they hardly infiltrated the tissue (left of dashed lines Figure 6H,K) unless they followed specific large periventricular spaces from penetrating vessels (arrow in Figure 6K). Parenchymal infiltrates were observed in other selected regions in close vicinity of the extraventricular CSF spaces. These areas included the white matter forming the ventral hippocampal commissure and fimbria adjacent to the velum interpositum (Figure 7A,B), as well as the brain structures ventral to the velum interpositum including the habenula which was infiltrated in all animals at the peak of the disease (Figure 6J). In the basal midbrain, immune cells were seen either along penetrating vessels dorsal to the optic tract cistern, but not in the optic tract itself, or infiltrating the tissue on each side of the optic chiasma and median eminence.

In the hindbrain few immune cells were present in CSF within the fourth ventricle throughout the post-induction period, and their number increased at D11. At that time, occasional cells were seen in an immediate subependymal location in the central part of the fourth ventricle (Figure 6L) or associated to the glia limitans bordering the inferior cerebellar peduncles along the lateral recesses. At D11 numerous cells were also observed deeper in the periventricular tissue at the level of both the central and lateral part of the fourth ventricle and its recesses. They infiltrated following a downward CSF-to-tissue density gradient or formed perivascular cuffs around blood vessels in the vicinity of the ventricular CSF (Figure 6M). Cell infiltrates around perivascular spaces were also seen in the vicinity of basal meninges at D11 (not shown). Perivascular spaces of deep vessels in the pons, medulla oblongata and cerebellum were spared (Figure 6N), and infiltration of basolateral cerebellar meninges was not observed or limited. In general the cerebellum did not display any inflammatory involvement, with only

occasional increased numbers of immune cells in the larger sulci of this structure. Immune cells were numerous in the meninges surrounding the spinal cord, and displayed a spreading pattern following a downward gradient from the surface to the central core of the cord, either as scattered cells or along radially oriented perivascular spaces. The region dorsal to the central canal was prominently invaded (Figure 6O).

The phenotype of the immune cells invading the brain during EAE was investigated in more details. All monocytes/macrophages, T cells, B cells and neutrophils were found in cisternal compartments and in tissue infiltrates, albeit in different proportions. At the onset of neurological signs, the majority of leukocytes were CD68<sup>+</sup> or CD3<sup>+</sup> cells (Figure 7A,B). A significant number of MPO<sup>+</sup> cells was already present (Figure 7A). Very few cells were CD45RA<sup>+</sup> positive (Figure 7B insert). By D11, cells that were present in periventricular clusters (Figure 7C-G) and in cisterns (Figure 7H,I) were mostly CD3<sup>+</sup> or CD68<sup>+</sup> cells, the proportion of these two cell types varying among clusters. Both cell types have been found disseminating from the periventricular clusters in the tissue or along perivascular spaces (Figure 7D,F,G).

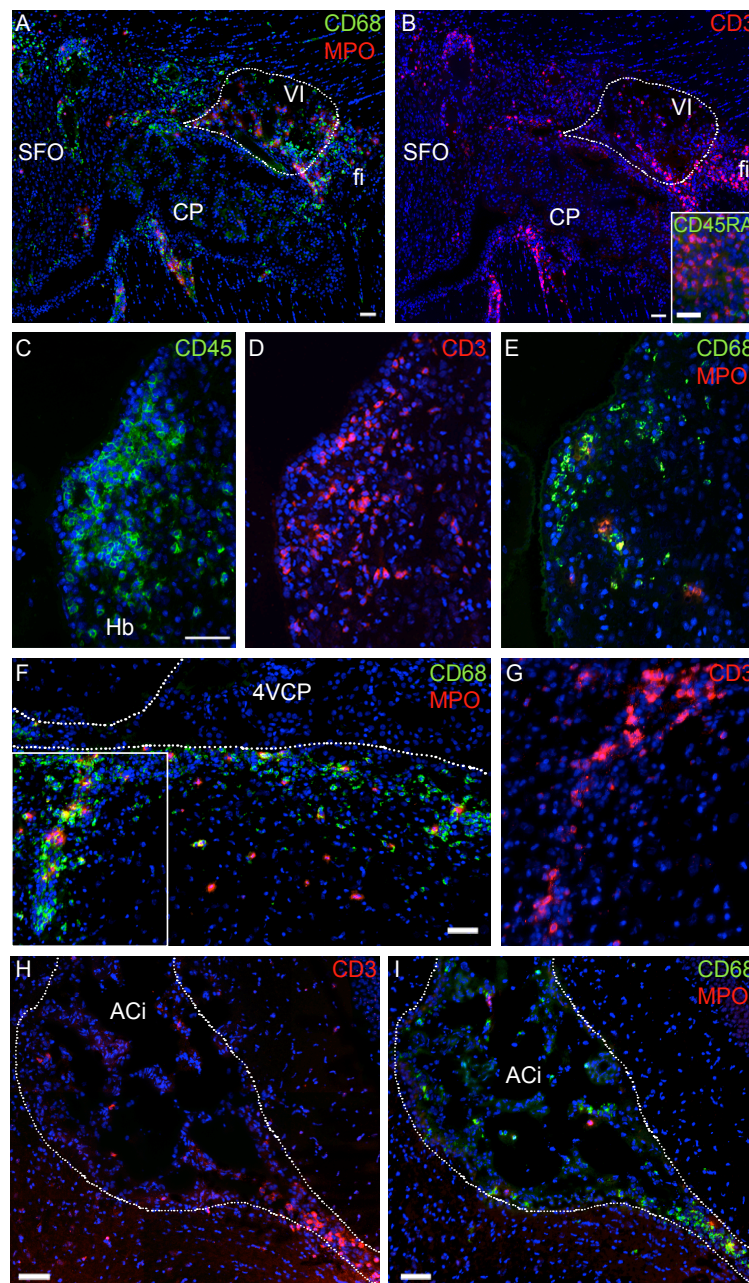
Finally, despite the large infiltrates observed in periventricular areas in the vicinity of some circumventricular organs during EAE (Figure 7A,B), the number of immune cells within these organs was only marginally increased in comparison with sham rats. Cells were never present in the subcommissural organ of any animal.

### ***Distribution and phenotypic analysis of immune cells in the brain of control, sham and EAE-diseased mice***

Brain sections from control mice were subjected to a thorough search of immune cells using antibodies raised against CD3 and CD68. CD3<sup>+</sup> cells were scarce and did not display any preferential localization in the parenchymal, cisternal, or meningeal spaces. CD68<sup>+</sup> cells were more abundant than CD3<sup>+</sup> cells, and like in rat were found preferentially in the velum interpositum, the optic tract and ambient cisterns (Figure 8A) as well as in all CPs (Figure 4B). In brain parenchyma the CD68 antibody also labelled microglial cells, recognizable by their specific morphology (not shown). Based on that discriminating criterion, non-microglial CD68<sup>+</sup> cells were rare in the neuropil, with no difference between the rostral and caudal parts of the brain.

In sham mice, no difference in the number and repartition of immune cells were observed at D1 in comparison with control animals. In one out of three mice sacrificed at D8 and in all mice sacrificed at D11-13 an increased number of CD68<sup>+</sup> cells and the presence of CD3<sup>+</sup> cells



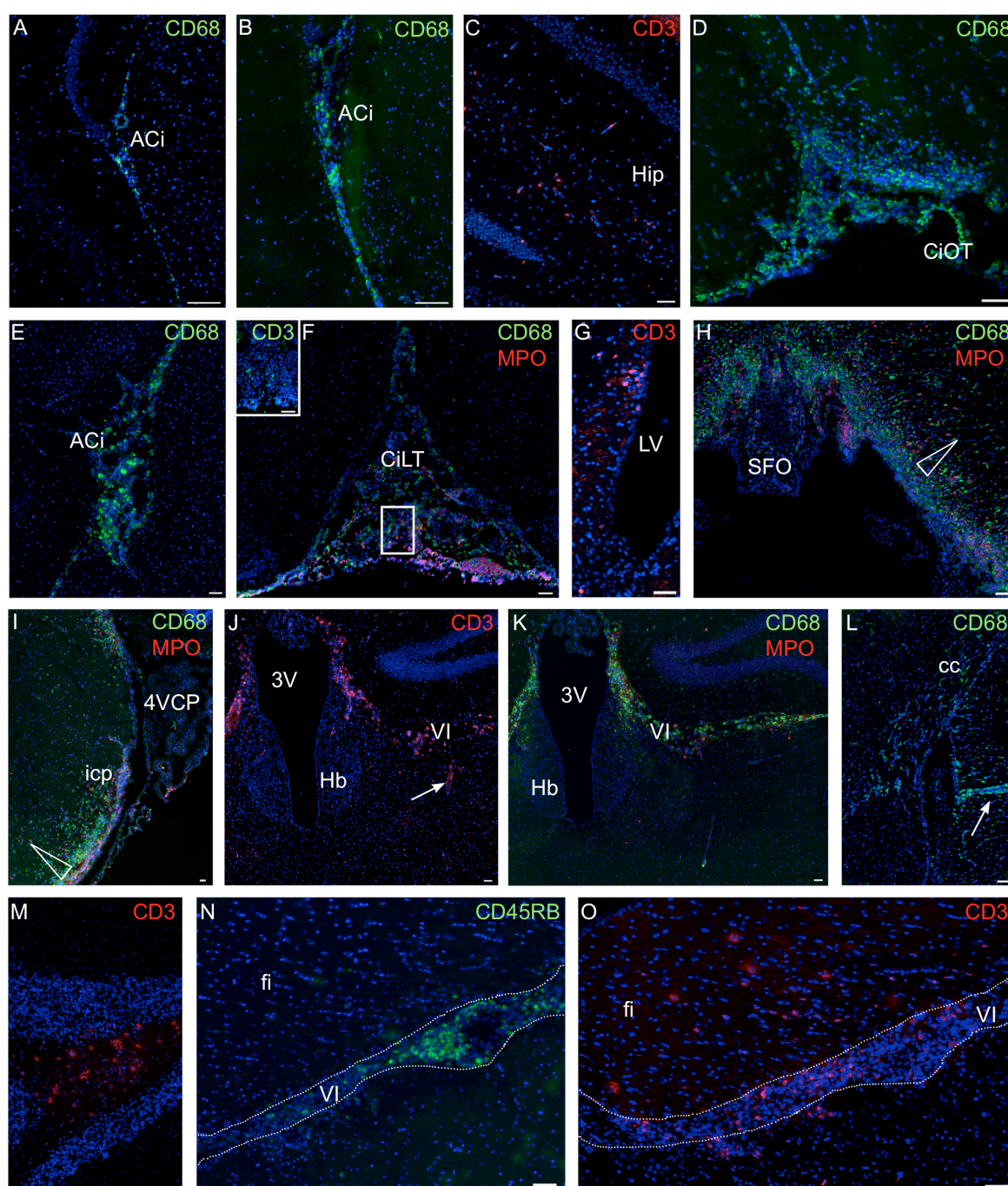


**Figure 7:** Phenotypic analysis of immune cells infiltrating the CSF spaces and brain parenchyma of rat during EAE

A, B.  $CD68^+$ ,  $MPO^+$  (A),  $CD3^+$  (B) and  $CD45RA^+$  (B insert, green) cells are shown at D9 in the area of the subfornical organ.  $CD68^+$  and  $CD3^+$  cells forms the majority of the cells in the infiltrates, a significant proportion of  $MPO^+$  cells and very few  $CD45RA^+$  cells are also observed. Note the limited number of immune cells associated with the subfornical organ. C-I. Identification of the cell types infiltrating the brain at D11. The two main populations of immune cells remain  $CD3^+$  and  $CD68^+$  cells but the proportion of these two cell types vary from cluster to cluster. C shows a periventricular parenchyma cell cluster from the forebrain which is largely formed of  $CD3^+$  cells (D, E). An infiltrate of immune cell in the periventricular medulla close to the CP spreads in part along a vessel, and contains a large number of monocytes/macrophages (F). The perivascular area also contains  $CD3^+$  cells (G, corresponding to the rectangle in F). The large proportion of  $CD3^+$ , and  $CD68^+$  cells infiltrating the internal CSF cisterns is shown at the level of the ambient cistern (H, I). The number of neutrophils remains very limited in both parenchymal and CSF compartment location (E, F, I). Scale bar, 50  $\mu m$ . Dashed lines delimit ventricles (F) or cisterns (H, I). 4VCP: fourth ventricle choroid plexus; ACi: ambient cistern, fi: fimbria; SFO: subfornical organ.



were observed in the velum interpositum, the cisterns of the optic tract and the ambient cisterns in the forebrain (Figure 8B). At the latest time, this observation extended to the meninges at the base of the brain and the cistern of the lamina terminalis (not shown). This increase in cell number was more prominent in the rostral than in the caudal part of the brain. Half of these sham mice also had CD68<sup>+</sup>, and to a lesser extent MPO<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells infiltrating the hippocampus without forming cell clusters (Figure 8C). No change in the morphology or staining pattern of the microglia was seen in sham animals, and B cells were absent from their brain. In both control and sham animals occasional CD68<sup>+</sup> immune cells were observed in an ependymal/subependymal localization (not shown).



The quantification of immune cells associated with the CP stroma of all control, sham and EAE-diseased mice did not reveal any difference in CD68<sup>+</sup> cell numbers between groups (Fig 4B), and only a modest increase of CD3<sup>+</sup> cells in sham and EAE-diseased animals compared with controls (Figure 4C). By contrast, all mice subjected to EAE presented on D8 prior to neurological signs an increased number of both CD68<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells in the velum interpositum, the cisterns of the optic tract, the interpeduncular and ambient cisterns, and the meninges at the base of the brain in comparison with sham animals. At the onset of the neurological disease, cell numbers increased even further in the velum interpositum and in CSF-containing cisterns of the forebrain and midbrain (Figure 8D,E,J), and neutrophils were also present (Figure 8K). Infiltrates extended up to the more rostral cistern of the lamina terminalis (Figure 8F). Immune cells were also observed in the ventricular CSF, and in subependymal locations (Figure 8G). Scattered CD68<sup>+</sup> cells and CD3<sup>+</sup> cells, and in a lower proportion MPO<sup>+</sup> cells, disseminated in the hippocampal commissure and fimbriae close to the rostral pocket of the velum interpositum in the vicinity of the subfornical organ (Figure 8H). They also invaded as clusters, other selected areas adjacent to CSF-filled compartments such as the thalamic areas bordering the third ventricle and the velum interpositum, the

**Figure 8:** Distinctive localization of immune cells in the CNS of EAE-diseased mice

A. Localization of leukocytes in the brain of control mice. Leukocytes are mainly CD68<sup>+</sup> cells and preferentially localize in basal and internal cisterns of the brain such as the ambient cistern. B,C. Increases in leukocyte number in the brain of sham animals. At P10-14, the number of CD68<sup>+</sup> cells slightly increases in these CSF compartments (B), and leukocytes, including CD3<sup>+</sup> cells to some extent infiltrate the hippocampus (C). D-O. Immune cell infiltration in the brain of animal with EAE. D, F, H, L are from animals with a clinical score of 1 and E,G, I-K, M-O, from animals with a clinical score of 4. Similar observations were made for both scores. The number of CD68<sup>+</sup> cells increases drastically in the extraventricular CSF compartments such as the cisterns of the optic tract (D), interpeduncular and ambient cisterns (E), the velum interpositum (K), and the meninges at the base of the brain. Leukocytes spreading in extraventricular spaces reach rostrally the cistern of the laminae terminalis (F). CD3<sup>+</sup> and MPO<sup>+</sup> cells are also present in these spaces (F, insert in F, J,K). Immune cells infiltrate the parenchyma in subependymal locations (G), and in forebrain and midbrain structures in close proximity to the CSF (H, J, K, L). Caudally Infiltrates reach structures juxting the lateral recesses of the fourth ventricle such as the inferior cerebellar peduncles (I). Tissue infiltration occurs following a downward CSF-to-tissue gradient (arrowhead in H and I) or along perivascular spaces (arrow in J and L). Tissue infiltrates are composed mainly of CD3<sup>+</sup> (J) and CD68<sup>+</sup> cells (H, I, K). To a lesser extent MPO<sup>+</sup> cells are also present (H, I, K). The mouse EAE model is characterized by the additional infiltration of CD68<sup>+</sup> and CD3<sup>+</sup> cells in the white matter of the corpus callosum (L) and of the cerebellum (M). B cells are found in CSF filled cisterns (N) in the same proportion as T cells, but do not invade the parenchyma as do CD3<sup>+</sup> cells (O). Scale bar, 50  $\mu$ m (A-H, J-O), 100  $\mu$ m (I). 3V: third ventricle; 4VCP: fourth ventricle choroid plexus; ACi: ambient cistern; cc: corpus callosum; CiLT: cistern of the laminae terminalis; CiOT: cistern of the optic tract; fi: fimbria; Hb: habenula; Hip: hippocampus; icp: inferior cerebellar peduncle; LV: lateral ventricle; SFO: subfornical organ; VI: velum interpositum

inferior cerebellar peduncles (Figure 8I) and the peripheral spinal cord. Immune cells disseminated in the tissue along a downward gradient from the CSF spaces to the deeper structures (Figure 8H,I arrowhead), as well as along perivascular spaces (Figure 8J,L arrows). The size of cell infiltrates in CSF-filled compartments and the distribution of cell clusters in the brain parenchyma were similar in mice with a clinical score of 1 or 4. CD68 staining was more intense in microglial cells located in close vicinity of infiltrates, suggestive of an activated phenotype for these resident cells (not shown).

The murine EAE model differed from the rodent one by the additional presence of infiltrates within discrete white matter structures such as the part of corpus callosum bordering the lateral ventricle (Figure 8L), the optic tract along the optic cistern and the cerebellar tracts (Figure 8M), as well as the absence of infiltrates in the habenula (Figure 8J,K). Another characteristic of the mouse EAE model was the presence of B cells in CSF-filled spaces in the same proportion as T cells. However, by contrast to T cells, B cells were confined to these spaces, and were absent from parenchyma clusters as observed at the level of the fimbria (compare Figure 8N with 8O), or more caudally in the cerebellar white matter.

Finally in control and sham mice, immune cells, mostly CD68<sup>+</sup> cells, could be only occasionally observed in the subfornical organ, median eminence and area postrema. Their number was marginally increased in animals suffering from EAE, except in the area postrema where the density of CD68<sup>+</sup> cells was higher and few CD3<sup>+</sup> cells were observed. This was in contrast with the prominent infiltrates observed in the vicinity of these circumventricular organs in EAE-diseased animals (Fig 8H).

## DISCUSSION

The present data describe the involvement of distinctive interconnected CSF-filled compartments as sites of immune cell homing and circulation within the CNS following peripheral inflammation and in the course of EAE.

### *Myeloid cell recruitment to the brain following peripheral inflammation*

Clinical and biological courses indicate that both sham and EAE-diseased animals undergo a sustained peripheral inflammation, characterized by oedema at the injection site, weight loss and a reversed T-lymphocyte/neutrophil ratio in blood throughout the 12 days of the experiment. In both sham rats and mice, a modest but consistent increase in the number of immune cells, mainly monocytes/macrophages, is observed in the velum interpositum, in the vicinity of the interventricular foramen of Monro and in the ambient and optic tract cisterns,

all located in the forebrain and midbrain. This recruitment takes several days to build up. It shows that a sustained peripheral insult such as that initiated by CFA impacts on the innate neuroimmune surveillance, and that immune cells other than the previously described memory T-cells patrolling the CSF [19], are involved in this surveillance. In line with this finding are the increased number of monocytes observed in periventricular areas of animals suffering from a sustained hepatic inflammation [10], as well as the recruitment of neutrophils into CSF-filled spaces in the brain of mice enduring a severe systemic lipopolysaccharide-induced inflammation [35].

***Velaes and cisterns of the forebrain and midbrain as homing sites for immune cells in the early stages of EAE***

The number of immune cells infiltrating as in sham animals, the same specific velaes and cisterns of the forebrain and midbrain largely increases in the early stages of EAE, i.e. prior to neurological signs in mouse or at the first appearance of these signs (score 1-2) in rat. At later stages (score 4 in rat, score 1 to 4 in mouse), immune cells spread to the more rostral cistern of the laminae terminalis and to caudal cisterns, and are found in distinctive areas of the surrounding neuropil. In the hindbrain, they infiltrate the tissue lining the lateral recesses of the fourth ventricle and the basal meninges at the level of the pons and medulla. They do not however reach the outermost internal cisterns such as the lateral rhinal fissure or the caudal superior medullary velum and adjacent ventrolateral cerebellar meninges in both rat and mouse. These data show that although EAE is often considered a spinal cord disease [2, 36], forebrain and midbrain are subjected early to leukocyte infiltration, a feature shared by MS. The data also highlight the previously ignored involvement of the velum interpositum, as well as the ambient and other central cisterns of the forebrain and midbrain in the cerebral distribution of immune cells during EAE. Undergoing a lower flow rate than the ventricles, these internal CSF-filled pockets through which major vessels such as choroidal arteries and internal cerebral veins are running, appear to be preferential niches for monocyte, T-cell, and in the mouse model, B-cell homing to the brain.

The limited information available concerning the membrane organisation of these spaces is restricted to human. The basal cisterns such as the interpeduncular fossa or the optic tract cistern share some anatomical similarities with the conventional external subarachnoid spaces, in particular the existence of arachnoid membranes trabeculae, but they display a more complex compartmentalization supported by the presence of several layers of the Liliequist's membrane [39]. The most internal CSF-filled spaces include the velum



interpositum which is closely associated with the choroidal tissue, and the ambient cisterns which in rodents hold the major intracranial fluid supply. These spaces resemble tangles of pia, pial-based tela choroidea, arachnoid membranes and other membrane-forming cells of undefined origin [27, 32, 43]. Whether specific adhesion molecules and inflammatory modulators expressed by this membranous network and by the glia limitans forming the cisternal ventrolateral borders [13] are responsible for immune cell residence within these spaces remains to be investigated.

Cerebral blood vessels acquire a blood-brain barrier phenotype after they cross the arachnoid membrane [7, 26]. Early infiltrating immune cells may nonetheless enter CSF directly from the vessels present in the cisternal spaces and the velum interpositum, as it was shown for post-activated migratory T cells in the meningeal vessels running at the surface of the spinal cord [2]. Extravasation mechanisms may however differ between the two sites. In the brain cisterns and velae, such infiltration presumably occurs only after vascular activation by pro-inflammatory factors or cells already circulating in CSF. Indeed, T cells, even pre-activated *in vitro*, fail to migrate across resting cerebral pial vessels [30]. Alternatively, in sham animals and during the early stages of EAE, immune cells may enter the ventricular CSF via the CP forming the BCSFB. This involves extravasation into the choroidal stroma and migration across the choroidal epithelial barrier into the fluid. Arguments in favour of this pathway include the lack of obvious aggregates around vessels in the cisternal spaces, the presence of immune cells in ependymal or subependymal position in all control, sham and EAE-diseased animals, and in the latter, the presence of infiltrates in periventricular areas such as the upper corner of the lateral ventricle, the hippocampal alveus, the corpus callosum, the habenula, and the inferior cerebellar peduncles. This distribution suggests that early infiltrating cells transit through the ventricular CSF and designate the CP as a possible gate of entry into the CNS. This hypothesis is further supported by data showing T lymphocytes and myeloid cells in the choroidal stroma (this work, [19, 28]). The mechanism of T-cell entry into the CSF may involve the adhesion molecules P- and E- selectins. These molecules are constitutively expressed on choroidal vessels and possibly meningeal but not parenchymal vessels, in human and in healthy C57BL/6 mouse, and P-selectin or PSGL-1 blocking strategies reduce early leukocyte infiltration [6, 19]. Other molecular determinants supporting the migration of immune cells through the choroidal epithelial layer into the CSF during the early phase of the disease remain to be identified.

Leukocyte tropism for CSF compartments will also depend on the chemokines that are secreted by neural cells in this fluid, before recruited immune cells *per se* produce

chemoattractant polypeptides. We detected basal levels of various chemokines active towards monocytes, T cells or neutrophils in the CSF of control and sham animals. The capacity of the choroidal epithelium to synthesise and secrete chemokines has been documented. Among others, the myeloid chemokine CCL2 is expressed in CPs from control rats and in cultured choroidal epithelial cells. Under resting conditions, low levels of the chemokine are secreted at the apical CSF-facing membrane of the epithelial monolayer [40]. Choroidal CCL2 expression is inducible by pro-inflammatory cytokines, and the chemokine is then secreted both apically and basolaterally [40, 41]. The myeloid chemokine CCL20, appearing as a key molecular determinant controlling CCR6-bearing Th17 cells infiltration during EAE initiation is also expressed by CP [34]. These choroidal chemoattractants can favor early immune cell migration across the CP into the ventricular CSF. They may also provide the appropriate chemokine environment for the homing of activated monocytes and specific subsets of T cells to CSF-filled internal compartments such as the velum interpositum. The thin layer delimiting the CP-containing ventricle from this CSF pocket is permeable to polar tracers [13, 31]. Chemokine diffusion across this layer could contribute to the marked accumulation of immune cells in the surrounding tissue during EAE (Figures 6G and 8J,K).

***Phenotypic multiplicity and compartmentalization of immune cells in the brain during the early stages of EAE***

The concurrent infiltration of CD68<sup>+</sup> cells and CD3<sup>+</sup> cells in CSF compartments of the forebrain and midbrain, and in periventricular tissues during the early phase of EAE in both animal models points to myeloid cells as important effectors in the initiation of the disease in addition to the T lymphocytes. The first infiltrating immune cells detected in the spinal cord of DA rats suffering from EAE are also macrophages [25]. These cells have a stimulating potential towards T-cell responses, and are a major source of inflammatory and potentially cytotoxic mediators [16]. They could support initial antigen presentation to penetrating T cells within the brain itself. In agreement with these crucial roles of CSF macrophages, blocking their function in the inductive phase of EAE generated by adoptive transfer of MBP-reactive T blasts in mice impeded spinal cord infiltration by these and other leukocytes present in the spinal leptomeninges [42].

Besides macrophages, other central CNS-antigen presenting cells may reactivate the effector functions of T-cells triggering further tissue damage. These include subarachnoid resident dendritic cells, but apparently not the parenchymal microglial cells [2, 4, 18, 25]. Although often classified with meningeal antigen presenting cells [18], the dendritic cells and

macrophages identified in the choroidal stroma [23, 28, 38] lie outside the central compartment. They are therefore likely to present immunogens that are different from the CNS antigens borne by cisternal and meningeal cells. This may explain why immune cells do not expand in CP during EAE (Fig 4), by contrast to the T-lymphocyte accumulation that has been observed in the stroma of mouse CPs following enterotoxin-induced systemic immune activation [29]. The limited increase in the number of T cells that we observed in the CP of sham and EAE-diseased mice likely reflects an enhanced T-cell transit from blood to CSF rather than a specific tropism for the CP tissue.

Neutrophils are present in the brain even in the early phases of the disease. Very few of them are associated with the membranous network of forebrain and midbrain cisterns or with tissue infiltrates. In the rat most of them are found circulating into the CSF where they may be necessary for the effector phase of EAE pathogenesis [24]. This is in contrast to MS, in which neutrophils are seldom detected in CSF [8]. Finally, B cells, found especially in the mouse model are restricted to the CSF-filled cisterns, resembling B-cell follicles detected in the meninges of patients with multiple sclerosis [22].

When clinical signs appear, both macrophages and T lymphocytes invaded structures of the brain close to periventricular or extraventricular CSF spaces. Preliminary data showed that proliferating Ki-67<sup>+</sup> cells represented less than 5% of the infiltrating cells, indicating that the large infiltrates observed do not result from cell proliferation only. Tissue invasion is more widespread in the mouse than in the rat model, and differs in its location. Optic tracts as well as the corpus callosum and the cerebellar white matter in particular, are subjected to cell infiltration in mouse, but spared in rat. This difference in the pattern of infiltration may be attributed to the immunogen used in mouse, which is more specific of the white matter. In contrast, habenula infiltration is a landmark of the rodent EAE model, an observation that remains to be understood. In both models tissue infiltration by myeloid cells and T lymphocytes presents a downward CSF-to-tissue density gradient, or alternatively organizes around perivascular spaces of the vessels lying in the vicinity of the CSF, but not in the deeper tissue. This again suggests that cells or molecular factors borne by the fluid are crucial determinants for initial tissue infiltration in the forebrain and midbrain, and indicates that perivascular spaces are preferential pathways of cell or proinflammatory factor diffusion from the CSF. This does not preclude a subsequent direct infiltration of immune cells across the endothelium of these vessels once they become activated.

To some extent the glia limitans surrounding the midbrain [13] seems to restrict tissue dissemination of immune cells present in the ambient cistern to the perivascular spaces.

Nevertheless, the specific neurodegeneration observed along these cisterns in a mouse EAE model [5] pointed out the cisternal immune cell infiltrates as a source of inflammatory factors able to exert a deleterious action on proximal neuronal networks. Of note, neither in rat nor in mouse tissue infiltrates are seen in the subpial layers of the cortices, despite the presence of vessels running at their surfaces. This likely results from the very limited CSF volume and low CSF circulation over the cerebral surface in rodents whose brains, apart for the rhinal fissure, lack the dense network of circumvolutions present in that of human and non-human primates.

In conclusion, this paper extends the spatiotemporal knowledge on early infiltration of immune cells in the CNS following peripheral inflammation and EAE, by describing in both rat and mouse the initial leukocyte infiltration of selected extraventricular CSF-filled compartments of the forebrain and midbrain such as the velum interpositum and the ambient cisterns. Involvement of blood-borne myeloid cells in both the immune surveillance of the brain and the effector phase of the neuroinflammatory disease is highlighted. The CPs are not sites for immune cell accumulation during EAE, but can participate in triggering the early infiltration of pathogenic immune cells into the CSF. The CSF pleiocytosis, CSF chemokine content, and pattern of cell infiltration in periventricular and pericisternal areas demonstrate the implication of the CSF circulatory system in the distribution of immune cells within the forebrain and midbrain during EAE.

### Acknowledgement

This work has been founded in part by the ARSEP (Aide à la Recherche sur la Sclérose en Plaques) Foundation and the Ligue Française contre la Sclérose en Plaques. CS is a recipient of ARSEP Foundation.

The authors declare that they have no conflict of interest.

### REFERENCES

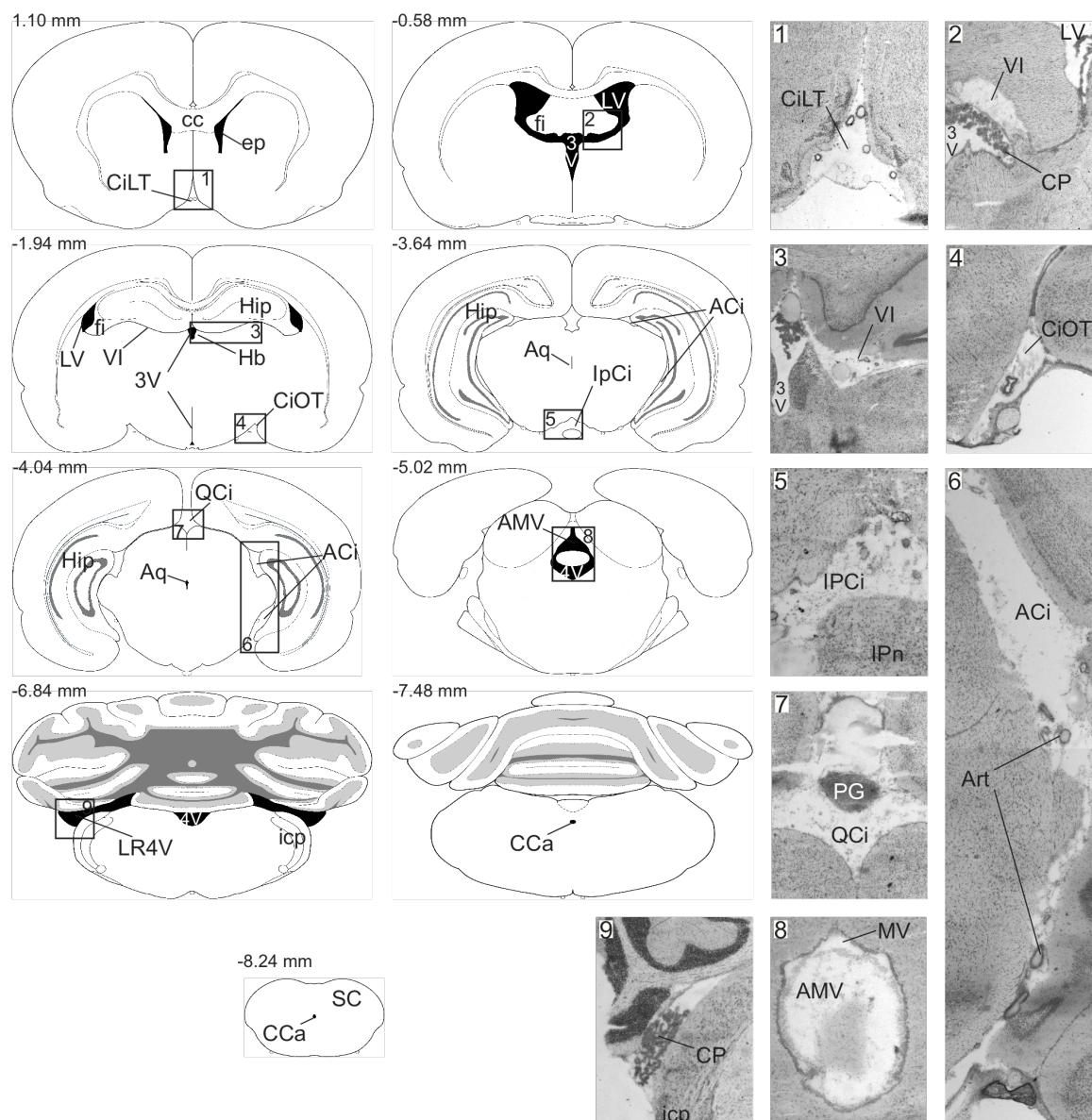
1. Allen IV, Kirk J (1997) The anatomical and molecular pathology of multiple sclerosis. In: Molecular biology of multiple sclerosis, Russell WC, (ed.), pp. 9-22, Wiley and sons.
2. Bartholomäus I, Kawakami N, Odoardi F, Schläger C, Miljkovic D, Ellwart JW, Klinkert WEF, Flügel-Koch C, Issekutz TB, Wekerle H, Flügel A (2009) Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature*.462:94-8.
3. Baxter AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol*.7:904-12.



4. Braun JS, Kaissling B, Le Hir M, Zenker W (1993) Cellular components of the immune barrier in the spinal meninges and dorsal root ganglia of the normal rat: immunohistochemical (MHC class II) and electron-microscopic observations. *Cell Tissue Res.*273:209-17.
5. Brown DA, Sawchenko PE (2007) Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol.*502:236-60.
6. Carrithers MD, Visintin I, Viret C, Janeway CS (2002) Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. *J Neuroimmunol.*129:51-7.
7. Cassella JP, Lawrenson JG, Allt G, Firth JA (1996) Ontogeny of four blood-brain barrier markers: an immunocytochemical comparison of pial and cerebral cortical microvessels. *J Anat.*189 ( Pt 2):407-15.
8. Chabas D, Ness J, Belman A, Yeh EA, Kuntz N, Gorman MP, Strober JB, De Kouchkovsky I, McCulloch C, Chitnis T, Rodriguez M, Weinstock-Guttman B, Krupp LB, Waubant E (2010) Younger children with MS have a distinct CSF inflammatory profile at disease onset. *Neurology.*74:399-405.
9. Charo IF, Ransohoff RM (2006) The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med.*354:610-21.
10. D'Mello C, Le T, Swain MG (2009) Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factoralpha signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci.*29:2089-102.
11. Engelhardt B (2006) Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm.*113:477-85.
12. Gazzin S, Strazielle N, Schmitt C, Fevre-Montange M, Ostrow JD, Tiribelli C, Ghersi-Egea J-F (2008) Differential expression of the multidrug resistance-related proteins ABCb1 and ABCc1 between blood-brain interfaces. *J Comp Neurol.*510:497-507.
13. Ghersi-Egea JF, Finnegan W, Chen JL, Fenstermacher JD (1996) Rapid distribution of intraventricularly administered sucrose into cerebrospinal fluid cisterns via subarachnoid velae in rat. *Neuroscience.*75:1271-88.
14. Ghersi-Egea JF, Gorevic PD, Ghiso J, Frangione B, Patlak CS, Fenstermacher JD (1996) Fate of cerebrospinal fluid-borne amyloid beta-peptide: rapid clearance into blood and appreciable accumulation by cerebral arteries. *J Neurochem.*67:880-3.
15. Giunti D, Borsellino G, Benelli R, Marchese M, Capello E, Valle MT, Pedemonte E, Noonan D, Albin A, Bernardi G, Mancardi GL, Battistini L, Uccelli A (2003) Phenotypic and functional analysis of T cells homing into the CSF of subjects with inflammatory diseases of the CNS. *J Leukoc Biol.*73:584-90.
16. Gordon S, Taylor PR (2005) Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.*5:953-64.
17. Greenwood J, Etienne-Manneville S, Adamson P, Couraud P-O (2002) Lymphocyte migration into the central nervous system: implication of ICAM-1 signalling at the blood-brain barrier. *Vascul Pharmacol.*38:315-22.
18. Kivisäkk P, Imitola J, Rasmussen S, Elyaman W, Zhu B, Ransohoff RM, Khoury SJ (2009) Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Ann Neurol.*65:457-69.
19. Kivisäkk P, Mahad DJ, Callahan MK, Trebst C, Tucky B, Wei T, Wu L, Baekkevold ES, Lassmann H, Staugaitis SM, Campbell JJ, Ransohoff RM (2003) Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci U S A.*100:8389-94.
20. Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C, Brück W, Rauschka H, Bergmann M, Schmidbauer M, Parisi JE, Lassmann H (2005) Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain.*128:2705-12.
21. Lassmann H (2007) Experimental models of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris).*163:651-5.
22. Magliozzi R, Howell O, Vora A, Serafini B, Nicholas R, Puopolo M, Reynolds R, Aloisi F (2007) Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain.*130:1089-104.
23. Matyszak MK, Lawson LJ, Perry VH, Gordon S (1992) Stromal macrophages of the choroid plexus situated at an interface between the brain and peripheral immune system constitutively express major histocompatibility class II antigens. *J Neuroimmunol.*40:173-81.
24. McColl SR, Staykova MA, Wozniak A, Fordham S, Bruce J, Willenborg DO (1998) Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.*161:6421-6.
25. Mensah-Brown EP, Shahin A, Al Shamisi M, Lukic ML (2011) Early influx of macrophages determines susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti (DA) rats. *J Neuroimmunol.*232:68-74.
26. Nag S, Venugopalan R, Stewart DJ (2007) Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol.*114:459-69.

27. Nagata S, Rhoton AL, Jr., Barry M (1988) Microsurgical anatomy of the choroidal fissure. *Surg Neurol*.30:3-59.
28. Nataf S, Strazielle N, Hatterer E, Mouchiroud G, Belin MF, Gherzi-Egea JF (2006) Rat choroid plexuses contain myeloid progenitors capable of differentiation toward macrophage or dendritic cell phenotypes. *Glia*.54:160-71.
29. Petito CK, Adkins B (2005) Choroid plexus selectively accumulates T-lymphocytes in normal controls and after peripheral immune activation. *J Neuroimmunol*.162:19-27.
30. Piccio L, Rossi B, Scarpini E, Laudanna C, Giagulli C, Issekutz AC, Vestweber D, Butcher EC, Constantin G (2002) Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *J Immunol*.168:1940-9.
31. Proescholdt MG, Hutto B, Brady LS, Herkenham M (2000) Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [14C]inulin in rat. *Neuroscience*.95:577-92.
32. Qi ST, Fan J, Zhang XA, Pan J Reinvestigation of the ambient cistern and its related arachnoid membranes: an anatomical study. *J Neurosurg*.115:171-8.
33. Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G (2003) Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol*.3:569-81.
34. Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F (2009) C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol*.10:514-23.
35. Rummel C, Inoue W, Poole S, Luheshi GN (2010) Leptin regulates leukocyte recruitment into the brain following systemic LPS-induced inflammation. *Mol Psychiatry*.15:523-34.
36. Schneider C, Schuetz G, Zollner TM (2009) Acute neuroinflammation in Lewis rats - a model for acute multiple sclerosis relapses. *J Neuroimmunol*.213:84-90.
37. Schulz M, Engelhardt B (2005) The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Res*.2:8.
38. Serot JM, Foliguet B, Bene MC, Faure GC (1997) Ultrastructural and immunohistological evidence for dendritic-like cells within human choroid plexus epithelium. *Neuroreport*.8:1995-8.
39. Sufianov AA, Sufianova GZ, Iakimov IA (2009) Microsurgical study of the interpeduncular cistern and its communication with adjoining cisterns. *Childs Nerv Syst*.25:301-8.
40. Szmydynger-Chodobska J, Strazielle N, Gandy JR, Keefe TH, Zink BJ, Gherzi-Egea JF, Chodobski A (2011) Posttraumatic invasion of monocytes across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*.32:93-104.
41. Thibeault I, Laflamme N, Rivest S (2001) Regulation of the gene encoding the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in the mouse and rat brain in response to circulating LPS and proinflammatory cytokines. *J Comp Neurol*.434:461-77.
42. Tran EH, Hoekstra K, van Rooijen N, Dijkstra CD, Owens T (1998) Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *J Immunol*.161:3767-75.
43. Tubbs RS, Louis RG, Jr., Wartmann CT, Loukas M, Shoja MM, Apaydin N, Oakes WJ (2008) The velum interpositum revisited and redefined. *Surg Radiol Anat*.30:131-5.

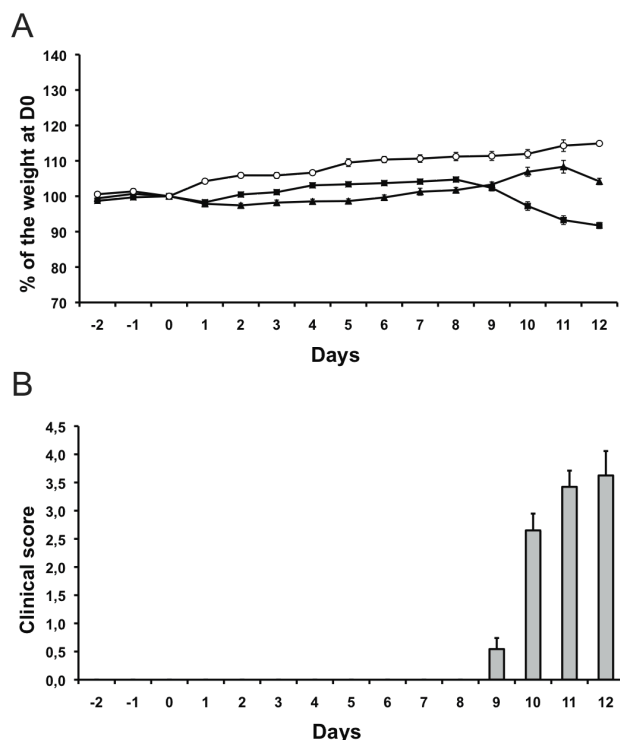
## Supplementary data 1



Representative drawing of the different areas selected for immunofluorescence analysis. Numbers correspond to bregma position. Numbered squares correspond to cresyl violet stained sections (right) highlighting the different extra-ventricular CSF-containing compartments.

3V, third ventricle - 4V, fourth ventricle - ACi, ambient cistern - AMV, anterior medullary velum - Aq, aqueduct - Art, arteries - cc, corpus callosum - CCa, central canal - CiLT, cistern of the laminae terminalis - CiOT, cistern of the optic tract - CP, choroid plexus - ep, ependyma - fi, fimbria - Hb, habenula - Hip, hippocampus - icp, inferior cerebellar peduncle - IPCi, interpeduncular cistern - IPn, interpeduncular nucleus - LR4V, lateral recess of 4V - LV, lateral ventricle - MV, mesencephalic ventricle - PG, pineal gland - QCi, quadrigeminal cistern - SC, spinal cord - VI, velum interpositum

## Supplementary data 2



Time course of the daily weight and clinical score in control, sham and EAE diseased rats. A. Weight of control (open circle), sham (triangle) and EAE diseased (square) rats. Data are expressed as the mean  $\pm$  SEM of the percentage of the initial weight of the animal at the time of the induction (D0). Data are combined from 4 different experiments for a total of 93 rats, with a minimum of 5 animals at each time point up to D11. One control, 1 sham and 7 EAE diseased animals were kept up to D12. The weight of both sham and EAE diseased animals is significantly lower than the weight of control animals, from D1 post-treatment, up to D9 (sham), or D11 (EAE). The weight of sham rats is significantly lower than the weight of EAE diseased animals from D2 to D8 post-treatment, then the weight of EAE diseased animals becomes significantly lower than the weight of sham animal from D10 to D12. (all levels of significance:  $p < 0.05$ ; Anova followed by post-hoc Tukey-Kramer test). B. Clinical course of EAE. The first neurological signs (onset) appeared on D9 and the peak of the disease occurred on D11-12, matching the period of prominent weight loss reported in A.



## **Partenaires moléculaires engagés dans la migration de cellules immunes au travers de la barrière sang-liquide céphalorachidien**

Récemment, sur la base d'observations générées par différentes approches, les plexus choroïdes ont été désignés comme un site potentiel de recrutement de cellules immunes à l'intérieur du SNC. Premièrement, au cours de la surveillance neuro-immunitaire du SNC, les espaces liquidiens remplis de LCR sont considérés comme constituant une voie prédominante de migration des lymphocytes T du sang vers le SNC (Charo and Ransohoff, 2006). Les leucocytes présents dans le LCR sont en majorité des cellules T mémoires exprimant PSGL1 (Ransohoff et al., 2003). Son récepteur spécifique, la molécule d'adhésion P-sélectine, est exprimée constitutivement par les vaisseaux fenêtrés du stroma des plexus choroïdes chez l'individu sain (Kivisäkk et al., 2003). Ceci suggère que l'interface des plexus choroïdes serait une voie d'entrée directe des lymphocytes dans le SNC. D'autres données obtenues chez l'animal et corroborées chez l'homme supportent ce concept (Reboldi et al., 2009). En effet, il a été montré que les plexus choroïdes expriment constitutivement CCL20 et que les lymphocytes Th17 expriment à leur surface CCR6, le ligand de CCL20. Cette interaction faciliterait le passage de ce type de lymphocytes à travers l'épithélium. Deuxièmement, des lymphocytes sont retrouvés dans les plexus choroïdes chez l'homme (Kivisäkk et al., 2003) mais également, chez l'animal contrôlé, ainsi que suite à une inflammation périphérique (Petito and Adkins, 2005). Nous avons observé dans nos travaux précédents, que dans les animaux contrôles la densité de cellules immunes, macrophages et lymphocytes T, est plus importante dans les plexus choroïdes que dans le parenchyme cérébral. Ceci conforte l'hypothèse du rôle des plexus choroïdes dans le passage de cellules immunes au cours de la surveillance immunitaire. Troisièmement, une analyse spatio-temporelle de la physiopathologie de l'EAE chez la souris montre que les zones de substance blanches périventriculaires et sous-piales sont des sites d'infiltration précoce de lymphocytes T, et de démyélinisation (Brown and Sawchenko, 2007). Au cours de nos travaux nous avons également montré que les infiltrats de cellules myéloïdes et lymphocytaires sont localisés préférentiellement dans les espaces liquidiens extraventriculaires, c'est-à-dire dans les citernes et les velums contenant du LCR, ainsi que dans les structures cérébrales adjacentes au LCR, notamment certaines zones périventriculaires. Ceci suggère l'implication des plexus choroïdes et du LCR dans le recrutement initial des cellules immunes au cours de l'EAE.



L'absence d'accumulation de cellules immunes dans le stroma des plexus choroïdes indique également que les plexus choroïdes seraient une voie de passage plutôt qu'un site d'accumulation. L'ensemble de ces données désigne le système plexus choroïdes-LCR comme une voie sous-estimée de circulation des effecteurs immunitaires au sein du SNC.

Afin de comprendre les mécanismes qui contrôlent le trafic des cellules spécifiquement au travers de l'interface sang-LCR, dans un contexte normal ou pro-inflammatoire, nous avons recherchés des déterminants moléculaires spécifiques des plexus choroïdes, susceptibles d'être impliqués dans la migration des leucocytes, tels que des molécules d'adhésion et des médiateurs de l'inflammation.

Nous avons initié cette étude par une comparaison des transcriptomes de la BHE et de la BSLCR. Des capillaires cérébraux et des plexus choroïdes ont été isolés d'animaux contrôles et d'animaux atteints d'EAE, au pic de la maladie. L'analyse du transcriptome de ces tissus, réalisée par la technologie Codelink était centrée sur des gènes potentiellement impliqués dans l'inflammation et la migration cellulaire, tels que des gènes de molécules d'adhésion, de chimiokines, de cytokines et de métalloprotéases.

Ces résultats préliminaires nous ont permis de sélectionner différents gènes, soit en raison de leur spécificité envers l'interface sang-LCR, soit en raison de l'induction de leur expression engendrée par l'EAE. Trois cytokines, sept chimiokines, deux récepteurs aux chimiokines et six molécules d'adhésion ont été ainsi sélectionnés. L'expression de ces gènes a alors été analysée par PCR quantitative dans des microvaisseaux et des plexus choroïdes isolés d'animaux Sham et EAE, à deux stades de la maladie, d'une part, avant les premiers signes cliniques, et d'autre part, au pic de la maladie.

## MATERIELS & METHODES

### **Animaux et isolement des capillaires et plexus choroïdes**

Les expérimentations animales ont été réalisées selon les directives approuvées par le Comité d'Ethique Français (décret 87-848) ainsi que par la directive de la Communauté Européenne 86-609-EEC. L'EAE ou une inflammation périphérique (Sham) sont initiées chez des rats Dark Agouti (DA), selon le protocole décrit au chapitre précédent. Concernant les rats EAE deux stades de la maladie ont été analysés : avant l'apparition de signes cliniques, Jour 6 et au

pic de la maladie, Jour 11. Après anesthésie gazeuse à l'isoflurane et décapitation de l'animal, le cerveau est prélevé puis maintenu à 4°C dans du tampon Krebs-Ringer (KR ; en mM : NaCl 135, KCl 4, CaCl<sub>2</sub> 2,2, MgCl<sub>2</sub> 1,2, NaHCO<sub>3</sub> 6, Hepes 10, Glucose 5, pH=7,4). Les plexus choroïdes des ventricules latéraux (PCVL) ainsi que du quatrième ventricule (PC4V) sont disséqués sous loupe binoculaire.

Les deux cortex sont isolés et nettoyés des méninges les recouvrant. Les capillaires cérébraux sont isolés à partir des cortex de 3 rats selon le protocole décrit par (Gazzin et al., 2008). Brièvement, les cortex sont homogénéisés dans du tampon KR avec 0,1% d'albumine de sérum bovin et centrifugés. La myéline est éliminée par centrifugation sur gradient de dextran et les capillaires cérébraux sont séparés des macrovaisseaux par filtration sur filtres au diamètre des pores décroissant. Les échantillons sont congelés à -80°C jusqu'à leur utilisation.

### **Analyse de l'expression des transcrits pour les molécules d'adhésion, les cytokines, les chimiokines et leurs récepteurs**

Les ARN totaux sont extraits des échantillons tissulaires en utilisant le kit RNeasy<sup>®</sup> Micro de chez Qiagen (Valencia, CA). L'expression des transcrits a été analysée par PCR quantitative, après une étape de transcription inverse. Les amorces ont été définies avec le logiciel PRIMER-BLAST, disponible en ligne (Table 1). L'expression des transcrits du gène de ménage classiquement utilisé, Hypoxanthine-guanine phosphoribosyltransferase, a d'abord été analysée. Son expression n'étant pas similaire entre les différents types d'échantillons, une recherche d'autres gènes de ménages a identifié Yars (Tyrosyl-tRNA synthetase) comme étant un gène de ménage plus approprié. Les réactions de PCR ont été réalisées à partir de 500 ng de produit de rétro-transcription, les ADN complémentaires (ADNc). Pour chaque gène, la concentration optimale en MgCl<sub>2</sub> a été définie et l'efficacité d'amplification a été déterminée grâce à l'établissement de gammes, issues de dilutions d'un pool d'ADNc. L'amplification des ADNc est réalisée par le Lightcycler Carousel de chez Roche et les CP (crossing point) sont alors définis, il s'agit du nombre de cycle nécessaire pour que la quantité de fluorescence, proportionnelle à la quantité de copie d'ADNc, soit différente du bruit de fond. Le niveau relatif d'expression de l'ADNc d'intérêt pour les différents échantillons testés, est défini par rapport à la gamme pré-établie pour ce gène, analysée par régression non linéaire. Afin d'estimer le rapport relatif d'expression des différents gènes entre eux, la valeur du



niveau d'expression de chaque gène est calculé dans un échantillon de référence, défini arbitrairement comme étant l'échantillon PCVL Sham J11, selon la formule suivante :

$$\frac{\text{Efficacité}_{\text{Yars}}^{\text{CP}_{\text{Yars}}}}{\text{Efficacité}_{\text{cible}}^{\text{CP}_{\text{cible}}}}$$

Les valeurs ainsi obtenues sont normalisées par rapport à l'expression du gène Dpagt1, gène dont le niveau d'expression varie peu selon les échantillons, et fixée à 1 dans l'échantillon de référence, PCVL Sham J11.

Les valeurs du niveau d'expression de tous les échantillons pour un gène donné sont alors normalisées par rapport à la valeur du gène de l'échantillon de référence.

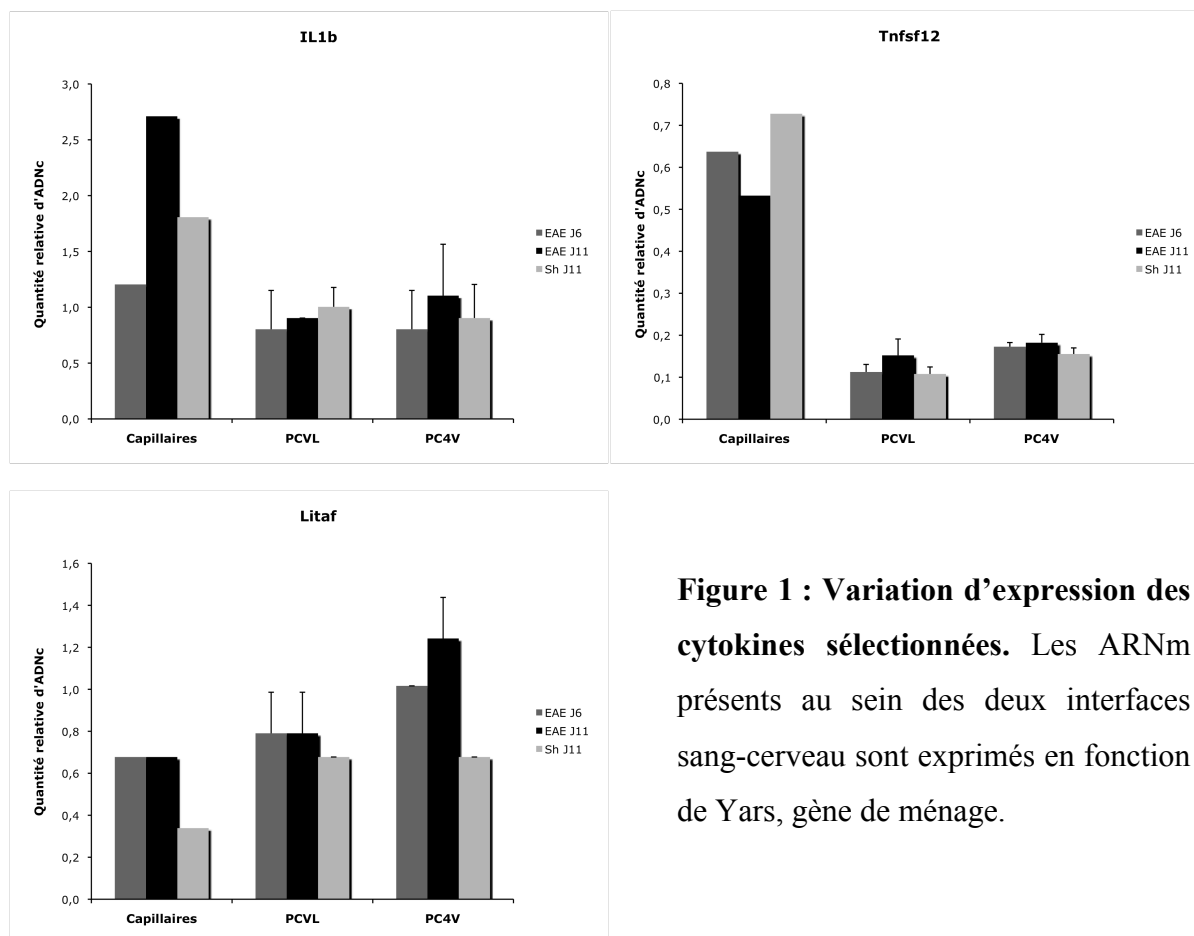
**Table 1 : Séquence des sondes et taille des produits de PCR**

	Gène	Sonde	Séquence	Taille du produit (paires de bases)
Cytokine	IL1b	S	5'-tgggcagctctccaggggaagc-3'	200
		A	5'-aatgctgcctcgtgacccc-3'	
	TNFsf12	S	5'-ccgtaccctccctgggctc-3'	143
		A	5'-gtggggaggtgctgtgtgc-3'	
	Litaf	S	5'-gtggccagccttgagctccg-3'	209
		A	5'-ggccccctgactccccaaa-3'	
Molecule d'adhésion	ALCAM	S	5'-tccagaacacgatgaggcagacga-3'	126
		A	5'-tagacgacaccggcgacgagg-3'	
	ESAM	S	5'-gggggtgggggtgaggagg-3'	151
		A	5'-cccagccaagccagcaggac-3'	
	ICAM-1	S	5'-gggccccgtgctctgaac-3'	182
		A	5'-tgcaggcccaccaggctga-3'	
	ICAM-2	S	5'-ccagcactggcacaggaggc-3'	147
		A	5'-agccagcgctgaaccacacc-3'	
	ITGB5	S	5'-actggtcccctgagggtgtc-3'	215
		A	5'-tcagaaaggaggcacatgccaga-3'	
Chimiokine et récepteur	ITGB6	S	5'-ggcgtggggactgtgtctgc-3'	138
		A	5'-tggtggcaccggtggcttg-3'	
	CCL5	S	5'-acctctcctcgactgccc-3'	159
		A	5'-ggttggcacacacttgccgg-3'	
	CCL7	S	5'-ctcaaagccctgaagacag-3'	130
		A	5'-ccgttctacccttaggac-3'	
	CCL20	S	5'-tgcccttctggttggtgcg-3'	219
		A	5'-gcttggtggtcagcgacacg-3'	
	CKLF1	S	5'-tggcacaagcccctgaaccg-3'	236
		A	5'-tggtggcaccggtggcttg-3'	
	CX3CL1	S	5'-caggaaaccaaaccctccaacc-3'	198
		A	5'-cggaaagctgccacggagg-3'	
	CXCL10	S	5'-ccctcaggcagctatgacggc-3'	105
		A	5'-ggagggtgtgtggagcaggc-3'	
	CXCL11	S	5'-cccttccccaaattaacacgaggcac-3'	184
		A	5'-tgcctcagtggaagccagtgt-3'	
	CCR5	S	5'-ctgtggcctgagaaggctggg-3'	143
		A	5'-cctgtctaggtgctccccacca-3'	
	CCR9	S	5'-tgggatggtgggacctagcc-3'	132
		A	5'-aaggggaggcagcaggagg-3'	
Std	YARS	S	5'-ccacctctcaccgctcca-3'	156
		A	5'-aggcaagatccttagccaggca-3'	

S : Sens ; A : Antisens ; Std : Standard

## RESULTATS

Les résultats sont exprimés en moyenne  $\pm$  écart-type pour les plexus choroïdes. Les plexus choroïdes de 3 rats ont été analysés séparément dans chaque condition. Cependant pour les capillaires, une seule valeur est donnée, en raison de la nécessité de pooler les capillaires des 3 rats pour obtenir une quantité d'ARN suffisante.

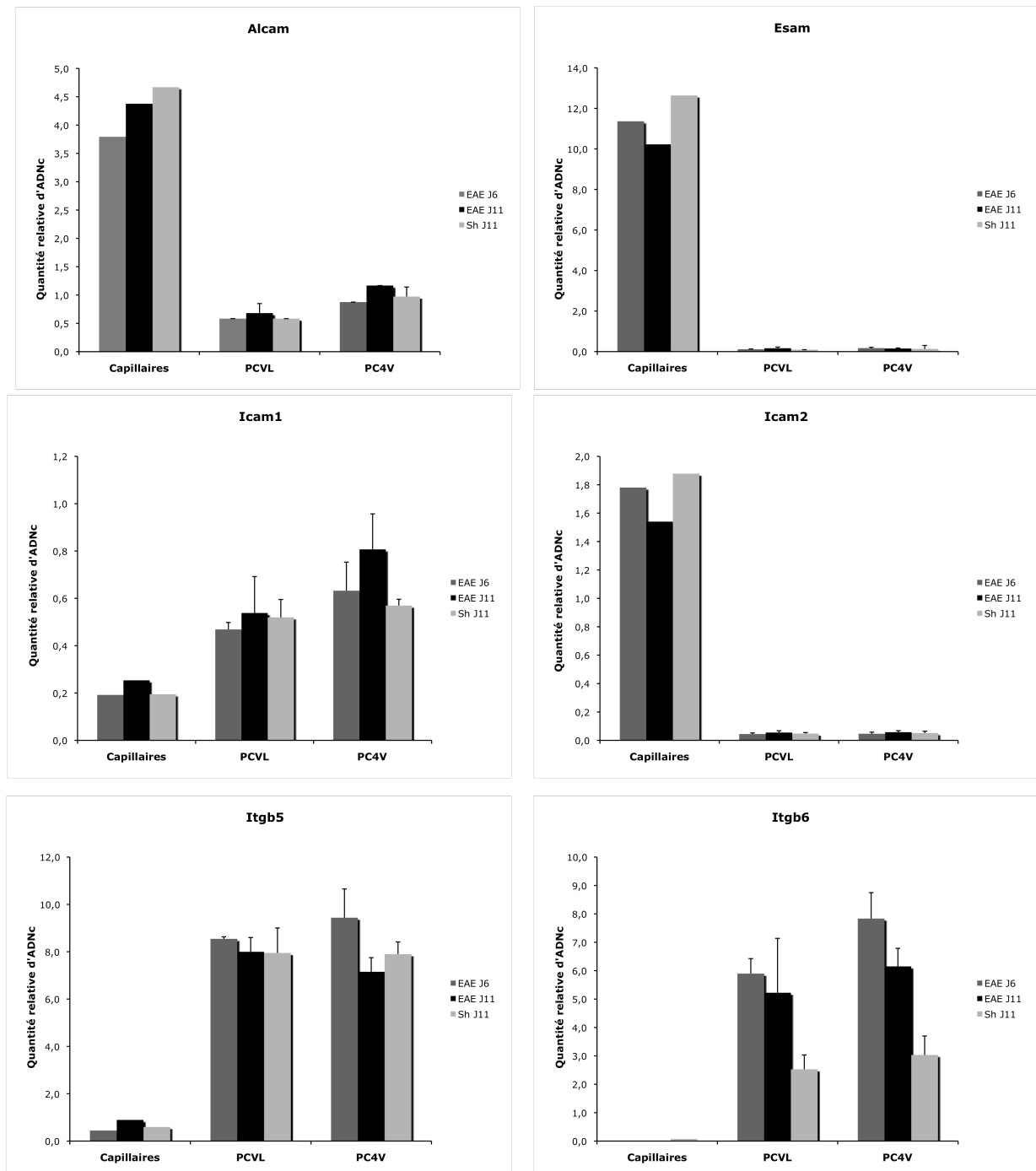


**Figure 1 : Variation d'expression des cytokines sélectionnées.** Les ARNm présents au sein des deux interfaces sang-cerveau sont exprimés en fonction de Yars, gène de ménage.

Concernant l'expression des transcrits des cytokines, il est difficile de déterminer une spécificité d'un gène pour une interface particulière. De même aucune variation significative n'est observée entre les animaux Sham et les animaux EAE pour ces 3 gènes dans les plexus choroïdes (Figure 1).

Les molécules d'adhésion Alcam, Esam et Icam2 sont exprimées plus spécifiquement par les capillaires cérébraux que par les plexus choroïdes (Figure 2). L'expression préférentielle d'Alcam (Cayrol et al., 2008) et Esam (Hirata et al., 2001) dans la BHE sont des données

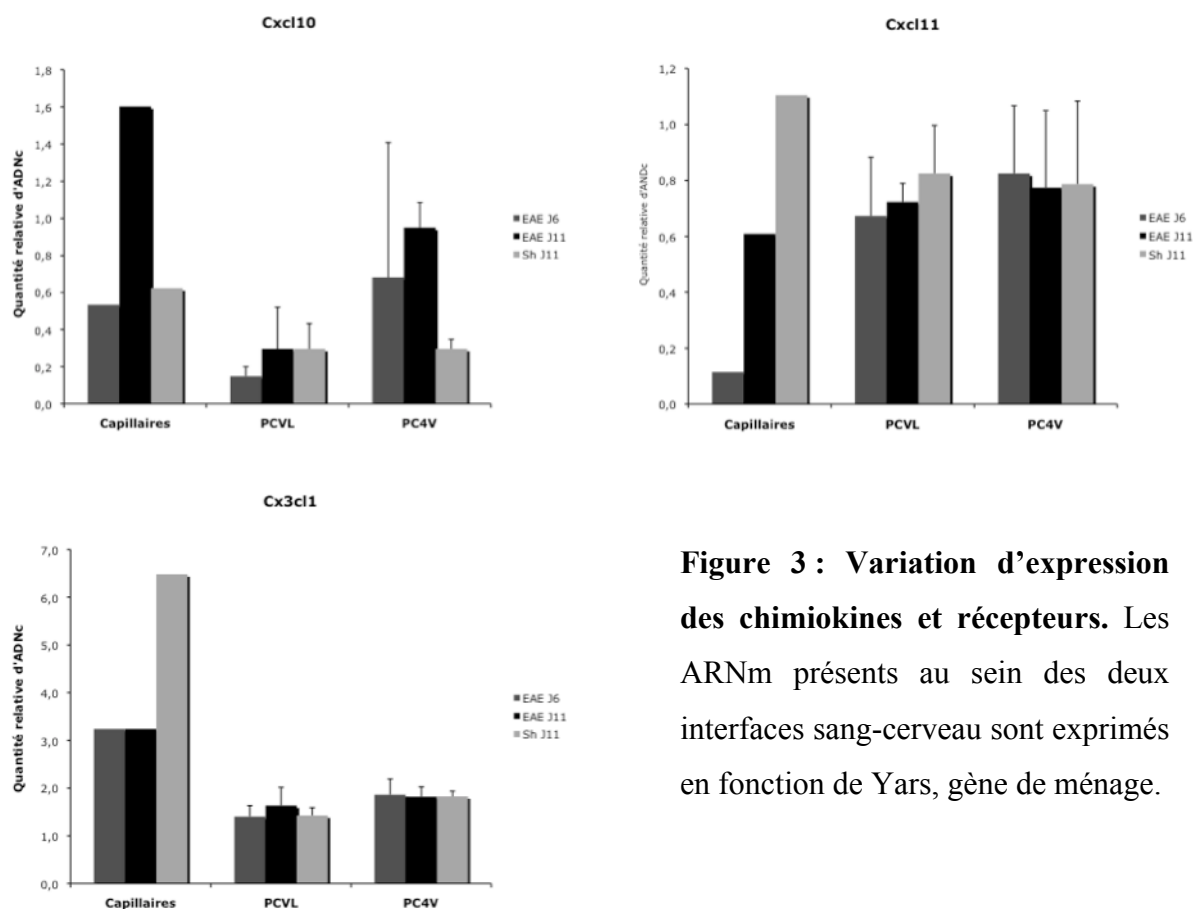
retrouvées également dans la littérature. Cela permet de valider la qualité des échantillons et le protocole utilisés. L'expression du gène *Icam1* est similaire entre les deux interfaces. Parmi les gènes analysés, seules les deux intégrines *beta5* (*ITGB5*) et *beta6* (*ITGB6*) sont spécifiques des plexus choroïdes. Le niveau d'expression de ces intégrines est similaire au niveau d'expression d'Esam, ce qui révèle une expression non marginale. Cependant, aucune



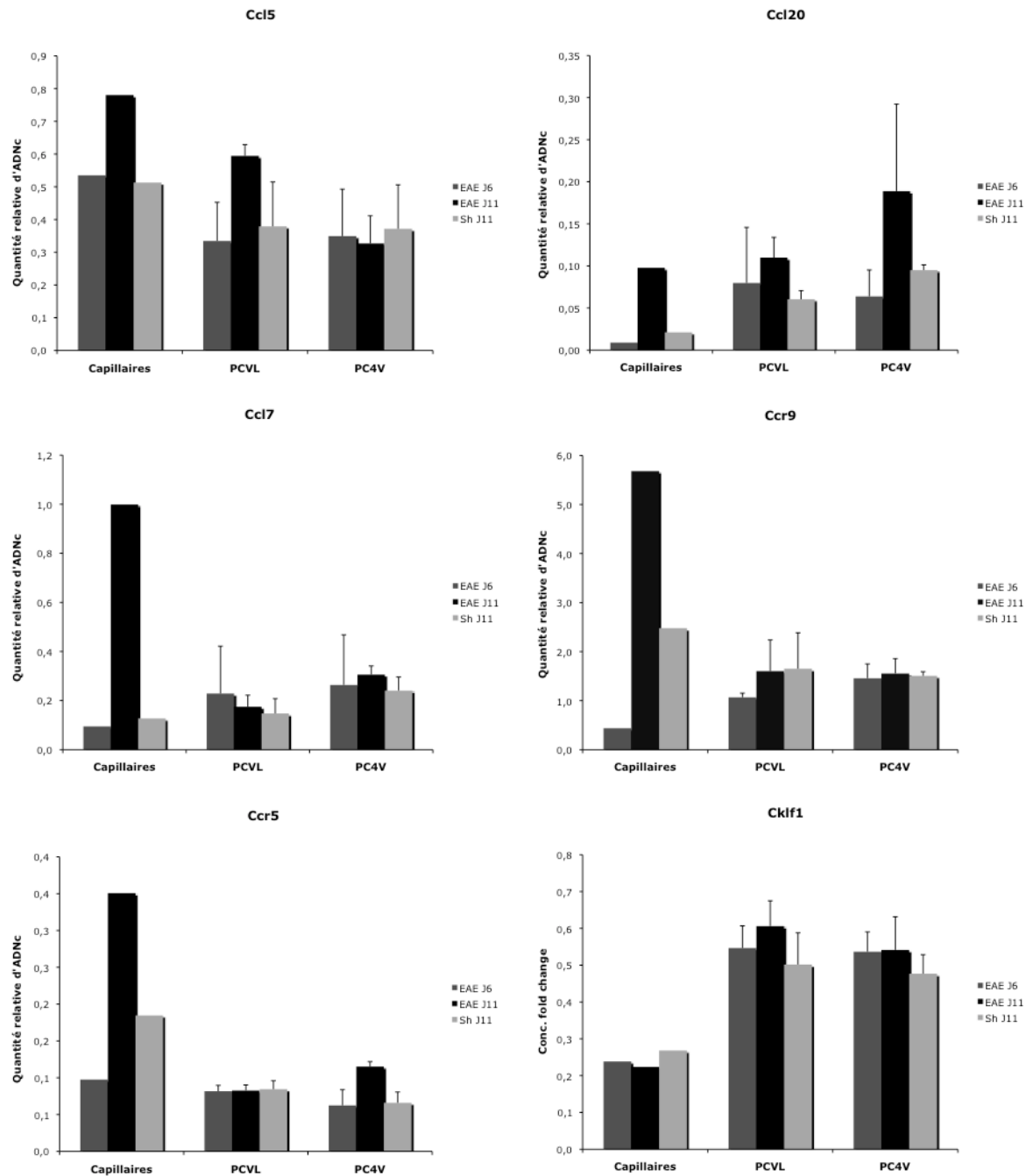
**Figure 2 : Variation d'expression des molécules d'adhésion sélectionnées.** Les ARNm présents au sein des deux interfaces sang-cerveau sont exprimés en fonction de Yars, gène de ménage. Deux gènes, *ITGB5* et *ITGB6* sont spécifiques de la BSLCR.

variation significative de l'expression des transcrits des gènes de molécules d'adhésion n'est observée au cours de l'EAE dans les deux interfaces (Figure 2).

Parmi les chimiokines analysées, aucune ne semble être exprimée spécifiquement par la BHE ou la BSLCR. Au niveau des plexus choroïdes aucune variation significative n'est observée entre les animaux Sham et les animaux EAE. Les ARNm des récepteurs aux chimiokines CCR5 et CCR9 ainsi que des chimiokines CCL5, CCL7, CCL20 et CXCL10 semblent augmentés au cours de l'EAE dans les capillaires cérébraux, mais au pic de la maladie seulement (Figure 3). La significativité ne peut cependant être déterminée, du fait de la nécessité de pooler les capillaires de 3 animaux pour obtenir une seule valeur. Par conséquent les variations observées doivent être considérées avec prudence.



**Figure 3 : Variation d'expression des chimiokines et récepteurs.** Les ARNm présents au sein des deux interfaces sang-cerveau sont exprimés en fonction de Yars, gène de ménage.



**Figure 3 (suite) : Variations d'expression des chimiokines et récepteurs sélectionnés.** Les ARNm des chimiokines et récepteurs présents au sein des deux interfaces sang-cerveau sont exprimés en fonction de Yars, gène de ménage.

## DISCUSSION

Ces résultats montrent l'expression constitutive de différentes molécules d'adhésion, cytokines et chimiokines par les deux barrières, et mettent en avant la présence de deux intégrines spécifiques des plexus choroïdes, ITGB5 et ITGB6. Ces protéines sont connues pour interagir avec les composants de la matrice extracellulaire (Smith et al., 1990), pour jouer un rôle dans les mécanismes de migration/d'invasion de cellules tumorales (Regezi et al., 2002) et pour augmenter l'expression des métalloprotéases (Nadler et al., 2009). Elles pourraient donc être impliquées dans la réorganisation de l'épithélium choroïdien au cours de la migration de cellule immune dans le cadre de l'immunosurveillance.

Les variations d'expression des molécules immuno-actives au cours de l'EAE observées par l'analyse Codelink ne sont pas retrouvées sur cette étude par PCR quantitative. L'analyse par Codelink comparait des échantillons contrôles avec des échantillons EAE alors que l'analyse par PCR quantitative comparait des échantillons Sham avec des échantillons EAE. Cela suggère que les animaux Sham ne sont pas différents des animaux EAE mais que les animaux contrôles sont différents des animaux Sham. Et donc dans ce cas, les variations observées chez les animaux EAE par l'analyse Codelink seraient le résultat de l'inflammation périphérique et non de l'inflammation centrale. Il serait donc intéressant de comparer l'expression des gènes sélectionnés chez des animaux sains et sham par PCR quantitative, afin de confirmer les variations d'expression observées lors de l'analyse par Codelink.

Les résultats obtenus pour les capillaires cérébraux montrent que lorsqu'elle existe, l'induction de l'expression des gènes est plutôt faible et seulement visible au pic de la maladie. Ces variations correspondent donc à des modifications intervenant lorsque la maladie est établie, c'est-à-dire dans une seconde phase de recrutement leucocytaire et ne semblent pas être impliquées dans l'initiation de l'EAE. Par ailleurs, les capillaires ont été isolés à partir des cortex des rats. Or les infiltrats cellulaires ont été observés principalement dans le mésencéphale. Ceci peut expliquer les variations d'expression relativement faible des gènes analysés dans ces préparations.

Il est également important de tenir compte qu'une analyse d'expression des ARNm ne reflète pas nécessairement l'analyse de l'expression des protéines. De plus, des variations de recrutement à la membrane cellulaire de la protéine d'intérêt pourrait influencer la migration cellulaire et pourra faire l'objet d'investigations complémentaires.



## Capacité des plexus choroïdes à sécréter des molécules immuno-actives

La capacité des plexus choroïdes à sécréter des molécules immuno-actives en réponse à un stimulus inflammatoire est très peu évaluée. Les plexus choroïdes pourraient cependant être une source de chimiokines impliquées dans la régulation des échanges cellulaires entre le sang et les différents compartiments du SNC. Différentes données suggèrent que cette hypothèse soit plausible. Au cours des maladies neuro-inflammatoires telle que la SEP, le LCR des patients contient de taux élevés de CCL5 et de CXCL10 et les récepteurs de ces chimiokines sont exprimés à la surface des lymphocytes T retrouvés dans le LCR (Charo and Ransohoff, 2006; Sørensen et al., 1999). Dans un contexte inflammatoire périphérique, il a été montré que les plexus choroïdes jouent précocement un rôle dans le transfert d'information entre le système immunitaire en périphérie et le SNC par l'intermédiaire de cytokines pro-inflammatoires sécrétées localement (Strazielle and Gherzi-Egea, 2000). De même une injection systémique de LPS ou d'IL-1 chez des rats et des souris entraîne une augmentation de l'expression du gène codant pour CCL2 dans les plexus choroïdes (Thibeault et al., 2001). Lorsque les plexus choroïdes sont exposés *ex vivo* à des cytokines pro-inflammatoires, ils sécrètent alors des métalloprotéases (Strazielle et al., 2003). Des cellules épithéliales choroïdiennes en culture et des plexus choroïdes *in vivo* sous influence cytokinique sécrètent des chimiokines telle que CXCL1 (Szmydynger-Chodobska et al., 2009) et CCL2 (Szmydynger-Chodobska et al., 2011). Chez la souris, une étude a montré l'expression de TNF et d'IL-6 par les plexus choroïdes après une infection (Butchi et al., 2011). Une étude a également mis en évidence la présence de CCL21 par immunohistochimie dans les plexus choroïdes de patients atteints de SEP et également d'individu sain (Kivisakk et al., 2004). Enfin, nos travaux décrits précédemment ont d'une part révélé la présence de cytokines et chimiokines dans le LCR de rats contrôles et EAE et d'autre part montré l'expression constitutive des ARNm de certaines chimiokines par les plexus choroïdes.

L'ensemble de ces données désigne l'épithélium choroïdien comme une source possible de molécules immuno-actives fournissant des signaux directionnels aux leucocytes provenant des vaisseaux du stroma choroïdien, et/ou contribuant aux concentrations de chimiokines présentes dans le LCR.



Pour tester cette hypothèse, nous avons mené en parallèle une étude *in vitro* sur un modèle de culture primaire d'épithélium choroïdien et une étude *in vivo* chez le rat. Nous avons déterminé le profil de molécules immuno-actives sécrétées par l'épithélium choroïdien au pôle apical, en conditions physiologiques et sous l'influence d'IL-1 $\beta$ . Ce profil a été comparé au profil de molécules immuno-actives présentes dans le LCR de rats en conditions physiologiques ou inflammatoires, c'est-à-dire après l'injection d'IL-1 $\beta$  par voie intracérébroventriculaire. Cette approche permet de définir si les plexus choroïdes peuvent être une source significative de sécrétion pour les molécules retrouvées dans le LCR au cours de diverses situations physiopathologiques.

## MATERIELS & METHODES

### Réactifs

L'Interleukine-1 $\beta$  recombinante de rat provient de chez R&D system (ref. 501-RL, Abingdon, Grande Bretagne) et est dilué dans une solution de LCR artificiel (124mM NaCl ; 5 mM KCl ; 1,3 mM MgCl<sub>2</sub> ; 1 mM CaCl<sub>2</sub> ; 26 mM NaHCO<sub>3</sub> ; 10 mM Glucose) supplémenté avec de l'albumine de sérum bovin (IDBio, Limoges, France). Les cytokines et chimiokines présentes dans le LCR ou les milieu de culture sont identifiées par un kit de cytokine array (référence ARY008) Proteome Profiler™ de chez R&D system (Abingdon, Grande Bretagne).

### Animaux

Les expérimentations animales ont été réalisées selon les directives approuvées par le Comité d'Ethique Français (décret 87-848) ainsi que par la directive de la Communauté Européenne 86-609-EEC. Pour les expériences *in vitro* et *in vivo*, des rats Sprague-Dawley âgés de deux jours et adultes (250 grammes) provenant de chez Janvier (Saint Genest sur Isle, France) ont été utilisés.

### Modèle cellulaire de la BSLCR

Les plexus choroïdes des ventricules latéraux ont été isolés sous loupe binoculaire chez des rats Sprague-Dawley âgés de 2 jours afin de réaliser le modèle de barrière *in vitro*, selon le protocole précédemment décrit (Strazielle and Gherzi-Egea, 1999; Strazielle et al., 2003). Les cellules épithéliales isolées sont mises en culture sur des filtres microporeux de 0,33 cm<sup>2</sup> (Transwell-Clear, Costar Plastic, Cambridge, MA). Après 7 jours de culture, le milieu du

compartiment inférieur (représentant le compartiment sanguin) est remplacé par un milieu SFM (Serum Free Medium) supplémenté avec de l'albumine de sérum bovin à 0,1 %. Le compartiment apical (représentant le compartiment LCR) est remplacé par un milieu SFM supplémenté avec de l'albumine de sérum bovin à 0,1 % et contenant ou non de l'IL-1 $\beta$  à 50 pg/ml. Après 18 heures d'incubation, les milieux du compartiment supérieur de 4 filtres par condition, soit 4 x 220  $\mu$ l sont prélevés, mélangés puis centrifugés à 125 g pendant 5 minutes. 500  $\mu$ l du surnageant sont ensuite congelés à -80°C, jusqu'à l'analyse des taux de chimiokines.

### **Injection intracérébroventriculaire**

Après anesthésie par isoflurane, le rat mâle adulte est placé dans un appareil à stéréotaxie et maintenu sous anesthésie. Le museau de l'animal est légèrement surélevée, avec la barre de gueule à +5 mm par rapport à l'axe des barres d'oreille. Une incision de la peau est réalisée à la surface du crâne afin de laisser apparaître ce dernier. Après nettoyage de l'os, les coordonnées du bregma sont relevées. A partir du bregma, les coordonnées suivantes sont utilisées pour placer une canule d'injection dans le ventricule latéral gauche : rostro-caudal = bregma ; latéral = bregma +1,5 mm; dorso-ventral = bregma - 4,5mm. A l'aide d'une fraise, l'os est trépané. La solution d'IL-1 $\beta$  à 10 ng/ml ou de LCR artificiel (animaux Sham icv) est injectée à l'aide d'une pompe à une vitesse de 0,5  $\mu$ l/min pendant 20 minutes dans le ventricule latéral gauche. A la fin de l'injection, l'aiguille est laissée en place pendant 2 à 3 minutes puis enlevée lentement afin d'éviter une surpression. L'os du crâne est comblé à l'aide de ciment dentaire puis la peau est recousue.

### **Prélèvement de LCR**

Deux heures et demi après le début de l'injection ou directement sans injection pour les contrôles, les rats sont anesthésiés sous isoflurane est placé dans un appareil à stéréotaxie et maintenus sous anesthésie. La tête de l'animal est inclinée vers le bas avec un angle de 40-45° par rapport au plan horizontal. Une incision de la peau à l'arrière de la tête est réalisée entre les oreilles puis une autre perpendiculairement à la première afin d'exposer les muscles du cou. A l'aide d'une lame de scalpel les muscles sont détachés au niveau de leur point d'insertion sur le crâne, c'est à dire le long de la suture entre l'os occipital et l'os intraparietal. A l'aide d'un coton tige pour ne pas altérer la membrane recouvrant la *cisterna magna*, les muscles sont retirés vers l'arrière grâce à des roulements sur la surface de l'os occipital afin











































de découvrir la *cisterna magna*. Le prélèvement de LCR est réalisé grâce à une aiguille de gauge 30 dont le biseau est court. Celle-ci est placée à l'extrémité d'un bras de l'appareil orienté parallèlement à la surface du crâne. L'aiguille est connectée à un tube en polyéthylène préalablement traité avec une solution de LCR artificiel supplémenté en albumine de sérum bovin à 1% afin de limiter l'accrochage non-spécifique des protéines du LCR. Les échantillons sont maintenus à +4°C dans des tubes eppendorf. Afin d'éliminer d'éventuels débris ou cellules, les échantillons sont centrifugés 10 minutes à 350 g, les surnageants (70-150 µl) sont ensuite stockés à -80°C.

### Identification des molécules immuno-actives

L'ensemble des échantillons est décongelé et les LCR d'animaux de mêmes groupes, Contrôles, Sham icv ou IL-1 $\beta$ , sont regroupés. 500 µl de surnageant cellulaire et 540 µl de LCR de chaque groupe ont été analysés par le kit de cytokine array selon le protocole fourni. La révélation des membranes a été réalisée à l'aide du kit de révélation ECL de chez Millipore.

## RESULTATS

Les résultats sont obtenus sous la forme de spots d'intensités variables selon la présence de la molécule dans le milieu analysé. Les résultats obtenus pour certaines molécules analysées

	Contrôle	Sham icv	IL-1 $\beta$	Exposition
Chimiokines				
<b>CXCL2</b>				longue
<b>CXCL3</b>				longue
<b>CXCL5</b>				courte
<b>CXCL9</b>				longue
<b>CXCL10</b>				longue
<b>CCL3</b>				longue
<b>CCL5</b>				courte
<b>CCL20</b>				longue
Cytokines				
<b>GM-CSF</b>				longue
<b>IL-6</b>				longue
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>				longue
Autres				
<b>L-selectin</b>				courte
<b>sICAM-1</b>				longue
<b>TIMP-1</b>				courte

**Table 2 : Illustration des signaux obtenus dans le LCR des animaux, pour des molécules immuno-actives sélectionnées sur la base de l'augmentation de leur concentration après un traitement par IL-1 $\beta$ .**

dans le LCR de rat sont illustrés dans la Table 2. Afin de réaliser une analyse semi-quantitative, nous avons déterminé la présence (P) ou l'absence (nd, non détecté) de la molécule ainsi que les augmentation d'expression d'une molécule dans différentes conditions (+, ++, +++) par rapport au contrôle. Cependant, l'expression relative des molécules entre elles n'est pas analysable en raison des affinités différentes d'une molécule par rapport à l'anticorps présent sur la membrane. En fonction de l'intensité relative du signal, les films de révélation ont été exposés plus ou moins longtemps à la membrane. Ainsi la détection d'une molécule après une exposition longue plutôt que courte, signifie que l'expression est faible.

### Analyse des LCR

Parmi les 29 molécules immuno-actives analysées, seulement 5 d'entre elles ne sont pas retrouvées dans le LCR de rat contrôle (Table 3). Il existe donc une présence constitutive de chimiokines, cytokines et molécules d'adhésion dans le LCR chez les animaux sains. Les signaux obtenus pour certaines d'entre elles sont illustrés dans la Table 2. Pour les cytokines, ces signaux sont faibles ou à la limite de détection, et les résultats seront interprétés avec prudence.

Le LCR des rats Sham icv, analysé dans le but de définir les degrés d'inflammation déclenchée par le traumatisme de l'injection, révèle que de nombreuses molécules sont surexprimées, particulièrement les chimiokines CXCL1, CXCL2, CXCL10, CCL3 et CCL20 (Table 3). Cependant peu de variations sont visibles concernant les cytokines et les autres molécules analysées (Table 3). L'injection d'IL-1 $\beta$ , augmente spécifiquement la sécrétion de 14 molécules immuno-actives inscrites en gras dans la Table 3 et illustré dans la Table 2. Les principales chimiokines augmentées dans le LCR des animaux après traitement à l'IL-1 $\beta$ , sont CXCL2, CXCL3, deux chimio-attractants en particulier des neutrophiles ; CCL3, chimio-attractants en particulier des macrophages et CXCL10, CCL5 et CCL20, chimio-attractants en particulier des lymphocytes. Parmi les cytokines analysées, la sécrétion d'IL-6 semble particulièrement augmentée après l'injection d'IL-1 $\beta$ . Il en est de même pour les molécules d'adhésion sICAM-1, L-selectin et le facteur TIMP-1, inhibiteur des métalloprotéases (Table 2).

La source de sécrétion de ces différentes molécules n'est pas connue. Différents types cellulaires peuvent être à l'origine tels que les cellules épendymaires, les cellules épithéliales

choroïdiennes, toutes deux directement en contact avec le LCR et pouvant ainsi répondre rapidement au signal de l'IL-1 $\beta$ .

	Contrôle	Sham icv	IL-1 $\beta$
Chimiokines			
CXCL1	P	++++	++++
<b>CXCL2</b>	P	++	++++
<b>CXCL3</b>	nd	(P)	+
<b>CXCL5</b>	P	+	++
CXCL7	P	+	+
<b>CXCL9</b>	?	?	+
<b>CXCL10</b>	P	++	+++
<b>CCL3</b>	?	++	+++
<b>CCL5</b>	P	P	+
<b>CCL20</b>	P	++	++++
CX3CL1	P	+	+
Cytokines			
<b>GM-CSF</b>	P	nd	+
IGN- $\gamma$	(P)	(+)	(+)
IL-1 $\alpha$	(P)	+	?
IL-1 $\beta$	(P)	(P)	+
IL-1ra	(P)	(P)	+
IL-2	(P)	(P)	(P)
IL-3	(P)	(P)	+
IL-4	(P)	nd	+
<b>IL-6</b>	(P)	nd	++
IL-10	(P)	+	+
IL-13	(P)	(+)	(+)
IL-17	(P)	(P)	(+)
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	nd	(+)	++
Autres			
CNTF	nd	(P)	(P)
<b>L-selectin</b>	P	P	+
<b>sICAM-1</b>	P	P	+
<b>TIMP-1</b>	P	P	++
VEGF	(P)	+	+

**Table 3 : Analyse des cytokines et chimiokines présentes dans le LCR de rat contrôle, Sham icv et traité par IL-1 $\beta$ .** Un grand nombre de ces molécules sont présentes constitutivement dans le LCR des animaux contrôles. La sécrétion de 14 de ces molécules (en gras) est augmentée spécifiquement dans le LCR à la suite de l'injection d'IL-1 $\beta$ . P : présent ; nd : non détecté ; ? : indéterminé ; ( ) : à la limite de détection ; +, ++... : estimation de l'augmentation de la concentration par rapport au signal contrôle.

### Analyse des surnageants de culture

Une analyse identique a été réalisée sur le milieu de culture des cellules épithéliales choroïdiennes. Afin de mimer l'expérience *in vivo*, l'IL-1 $\beta$  a été placée au pôle apical des cellules représentant le LCR et le surnageant de ce même compartiment a été analysé après le traitement cytokinique. L'analyse des résultats révèle que dans des conditions normales, l'épithélium choroïdien sécrète constitutivement plusieurs chimiokines telles que CXCL1, CXCL5, CXCL7 et CCL20 ainsi que deux facteurs TIMP-1 et VEGF. Dans cette analyse, les seuils de détection des cytokines sont également faibles, comme lors de l'analyse des LCR. Par conséquent les résultats des cytokines sont à interpréter avec prudence. Après la stimulation par IL-1 $\beta$ , la sécrétion de la plupart des chimiokines est augmentée. Il en est de même pour le TNF- $\alpha$  et la molécule d'adhésion sICAM-1 (Table 4).

	Contrôle	IL-1 $\beta$
Chimiokines		
<b>CXCL1</b>	P	++++
<b>CXCL2</b>	(P)	++
<b>CXCL3</b>	nd	+++
<b>CXCL5</b>	P	++++
CXCL7	P	P
CXCL9	(P)	+
<b>CXCL10</b>	(P)	++
<b>CCL3</b>	nd	+
<b>CCL5</b>	(P)	++
<b>CCL20</b>	P	++++
<b>CX3CL1</b>	(P)	++
Cytokines		
GM-CSF	nd	+
IGN- $\gamma$	nd	+
IL-1 $\alpha$	(P)	+
IL-1 $\beta$	nd	+
IL-1ra	(P)	+
IL-2	(P)	+
IL-3	(P)	+
IL-4	?	+
IL-6	nd	+
IL-10	nd	+
IL-13	(P)	+
IL-17	(P)	+
<b>TNF-<math>\alpha</math></b>	nd	++
Autres		
CNTF	nd	(+)
L-selectin	(P)	+
<b>sICAM-1</b>	nd	++
TIMP-1	P	P
VEGF	P	+

**Table 4 : Profil d'expression des molécules immuno-actives sécrétées à la membrane apicale de l'épithélium choroïdien en culture dans des conditions contrôles et après stimulus inflammatoire.** Un grand nombre de ces molécules sont sécrétées constitutivement par l'épithélium choroïdien. La sécrétion de 11 de ces molécules (en gras) est augmentée spécifiquement à la suite du traitement par IL-1 $\beta$ . P : présent ; nd : non détecté ; ? : indéterminé ; ( ) : à la limite de détection ; +, ++... : estimation de l'augmentation de la sécrétion par rapport au signal contrôle.

## DISCUSSION

Les augmentations de sécrétion des molécules analysées dans le milieu de culture des cellules épithéliales choroïdiennes sont obtenues après une stimulation de l'épithélium avec une très faible dose d'IL-1 $\beta$  (100 pg/ml). Cela signifie que l'épithélium choroïdien est très sensible à l'IL-1 $\beta$ . La dose d'IL-1 $\beta$  utilisée (1 ng) dans le modèle *in vivo* correspond à une concentration locale plus élevée mais ne concerne qu'un seul plexus choroïde (le plexus choroïde du ventricule latéral gauche). Cette stimulation est plus brève en raison du renouvellement constant du LCR et à la diffusion de la molécule dans le parenchyme, contrairement au modèle *in vitro*, où l'IL-1 $\beta$  est constamment au contact des cellules. Le choix d'un traitement des cellules épithéliales de 18 heures résulte de la nécessité d'accumuler suffisamment de molécules immuno-actives pour être détectées. Au contraire, les animaux ont été traités par des temps plus courts (2,5 h) afin d'éviter l'infiltration de cellules immunes au sein du SNC. En effet, les leucocytes sont des sources potentielles de molécules immuno-actives, leur présence aurait influencé les concentrations de chimiokines sécrétées par les cellules neurales.

Les résultats de nos analyses montrent qu'il existe donc un taux constitutif de molécules immuno-actives pouvant ainsi influencer la migration des cellules immunes agissant dans le cadre de la surveillance neuro-immunitaire. Parmi les douze molécules immuno-actives présentes dans le LCR des rats contrôles, cinq d'entre elles sont retrouvées dans le surnageant des cellules épithéliales en culture en conditions physiologiques. Ceci signifie que les plexus choroïdes sont une source partielle de CXCL1, CXCL5, CXCL7, CCL20 et TIMP-1 sécrétées constitutivement dans LCR. Cependant, la source des autres chimiokines reste à déterminer.

Le traumatisme provoqué par l'injection (animaux Sham icv) induit la sécrétion de huit chimiokines dans le LCR. Le taux de CXCL1 est particulièrement augmenté par ce traumatisme. Les données obtenues grâce au modèle cellulaire révèlent que cette chimiokine est très rapidement sécrétée sous de très faibles doses d'IL-1 $\beta$ . Cela suggère que le traumatisme induit rapidement la sécrétion de cytokine, telle que l'IL-1 $\beta$ , induisant à son tour la sécrétion de chimiokines. L'épithélium choroïdien sécrétant de grande quantité de CXCL1, la source majoritaire de cette chimiokine dans le LCR des animaux Sham icv semble être les plexus choroïdes. Les autres chimiokines retrouvées dans le LCR de ces animaux semblent également provenir de la sécrétion plexuelle, puisque les cellules en culture sécrètent ces mêmes molécules sous stimulation cytokinique.

L'injection d'une très faible dose d'IL-1 $\beta$  dans le LCR, mimant les étapes précoces du développement d'une pathologie, entraîne l'expression de plusieurs chimiokines attractrices des différents types cellulaires. Les chimiokines CXCL2, CXCL3, CXCL5, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL5 et CCL20, ainsi que GM-CSF, IL-6, TNF- $\alpha$ , L-selectin, sICAM-1 et TIMP-1 sont retrouvés dans le LCR des rats traités par de l'IL-1 $\beta$ . Les cellules épithéliales choroïdiennes sécrètent de fortes concentrations de CXCL1, CXCL3, CXCL5 et CCL20 ainsi que de TNF- $\alpha$  et sICAM-1 sous l'influence cytokinique d'IL-1 $\beta$ . Ceci suggère que dans notre modèle *in vivo*, la source majoritaire de CXCL3, CXCL5, CCL20, TNF- $\alpha$  et sICAM-1 est l'épithélium des plexus choroïdes. Cependant, l'épithélium choroïdien n'est pas la source majeur de CXCL2, CXCL9, CXCL10, CCL3, CCL5, GM-CSF, IL-6, L-selectin, et TIMP-1 observés dans le modèle *in vivo*. Ceci suggère une source de sécrétion dans le LCR autre que les plexus choroïdes comme par exemple l'épendyme, ou les cellules gliales.





# DISCUSSION GENERALE



La SEP est une maladie inflammatoire, démyélinisante, dégénérative du SNC, contrôlée principalement par les lymphocytes T. L'infiltration des cellules immunes dans le SNC est un élément déterminant dans l'initiation de la pathogénèse. Des données récentes soulignent aujourd'hui l'importance d'un grand nombre de facteurs intervenant dans le développement de la pathologie. Parmi ceux-ci, des **cellules immunes** circulantes activées, l'expression de **molécules d'adhésion** à la surface des cellules formant **les différents sites d'entrée** dans le SNC et des **facteurs immuno-actifs** dans le milieu environnant, sont indispensables.

Dans notre travail de thèse, nous avons pour objectif principal d'évaluer dans des modèles de SEP, le rôle du système de circulation du LCR dans l'orchestration de l'infiltration des différents effecteurs immunitaires au cours de la pathologie.

Les résultats obtenus décrivent l'implication de certains compartiments liquidiens en tant que lieux de distribution et de circulation des cellules immunes, et ce sous l'influence de certaines molécules immuno-actives sécrétées dans le LCR.

### **La surveillance neuro-immunitaire dans un contexte d'inflammation périphérique**

Les suivis cliniques et biologiques des animaux Sham et EAE révèlent les caractéristiques d'une **inflammation périphérique**. Au cours des 10 jours suivant le traitement, un œdème se crée au site d'injection, les animaux perdent du poids et le rapport du nombre de lymphocytes T sur le nombre de neutrophiles dans le sang est inversé. Ces deux caractéristiques (œdème et rapport inversé) ont également été observées, chez des rats ayant reçu une injection de CFA dans la patte (Brooks et al., 2006). Ces différentes modifications étaient plus prononcées chez nos animaux Sham que chez nos animaux EAE. Cette différence observée entre Sham et EAE pourrait provenir de la différence de composition des émulsions injectées. En effet, les Sham ne reçoivent pas d'antigène cérébral, l'émulsion est donc uniquement composée d'huile et de solution de phosphate dans lequel se trouve le *Mycobacterium tuberculosis*. Il semble donc qu'une qualité d'émulsion différente puisse influencer la réponse inflammatoire.

En parallèle, chez les animaux Sham des deux espèces étudiées (rat et souris), l'inflammation périphérique se caractérise également par une augmentation, légère mais régulière du nombre de cellules immunes, au sein du SNC. Ce recrutement met plusieurs jours à se mettre en place. Cela montre qu'une inflammation périphérique telle que celle initiée par l'injection de

CFA, impacte sur la **surveillance neuro-immunitaire** du cerveau. Dans nos travaux, les cellules immunes infiltraient principalement les espaces liquidiens extraventriculaires, soit, le VI et les citernes du cerveau. Cette localisation particulière étend l'hypothèse apportée par les travaux de l'équipe de Ransohoff, de la surveillance neuro-immunitaire se déroulant dans les espaces sous-arachnoïdiens (Ransohoff et al., 2003), aux compartiments liquidiens internes du cerveau.

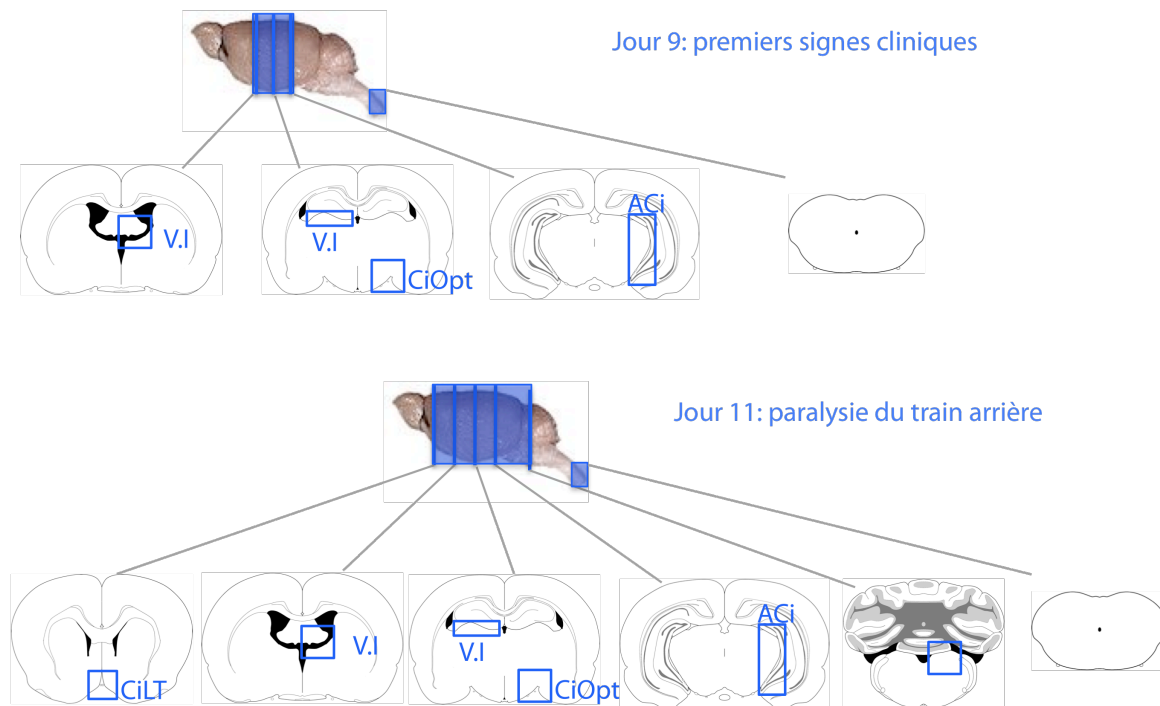
Cependant les études du groupe de Ransohoff concernent uniquement les lymphocytes T (Kivisäkk et al., 2003). Les cellules dont nous observons l'augmentation après l'inflammation périphérique sont principalement des **monocytes/macrophages**. Dans ce contexte, la surveillance neuro-immunitaire n'est donc pas effectuée uniquement par les lymphocytes T mémoires précédemment décrits dans le LCR. Les macrophages semblent avoir un rôle également dans cette surveillance mais qui n'est pas encore clairement défini. D'autres études ont également observé une augmentation du nombre de cellules immunes au sein du SNC après une inflammation périphérique. Des neutrophiles infiltraient le SNC après une inflammation systémique par du lipopolysaccharide (Bohatschek et al., 2001) (Jeong et al., 2010) ou une injection de toxine pertussis (Richard et al., 2011), et des macrophages infiltraient le cerveau après une inflammation hépatique (D'Mello et al., 2009).

Plusieurs hypothèses peuvent être suggérées quant à l'augmentation du nombre de macrophages dans le SNC des animaux Sham. Premièrement, il s'agit d'une inflammation initiée par du CFA qui contient du *Mycobacterium tuberculosis*. Il a été montré que cette bactérie entraîne une signalisation via les TLR2 et 4 à la surface des macrophages (Rocha-Ramírez et al., 2008). Ceci implique une **réponse immune innée**, au cours de laquelle les monocytes sanguins seront rapidement activés contrairement aux cellules de la lignée lymphoïdes. Une augmentation du niveau d'activation des monocytes faciliterait l'accès de ces cellules au SNC. Et ainsi expliquerait l'augmentation du nombre de macrophages dans le cerveau. Deuxièmement, des **chimiokines** spécifiques dans l'attraction des macrophages sont sécrétées constitutivement dans le LCR. Elles pourraient participer au recrutement central des monocytes. Cette hypothèse est détaillée plus précisément dans un des paragraphes suivants. Les différentes fonctions connues du macrophage sont la phagocytose et la présentation antigénique, mais dans le cerveau de nos animaux Sham, ces fonctions ne semblent pas pertinentes. Cependant, une des fonctions spécifiques des cellules myéloïdes est la fonction de '**sentinelle**', particulièrement attribuée aux cellules dendritiques. Les macrophages cérébraux ainsi que la microglie dans le cadre de la surveillance neuro-immunitaire ont également cette capacité. En effet, on retrouve dans le SNC des animaux contrôles

principalement des cellules myéloïdes, et les macrophages périvasculaires et la microglie ont pour rôle de patrouiller l'ensemble du SNC afin de prévenir d'éventuelles inflammations. Ainsi lors d'une inflammation périphérique, ce rôle serait renforcé par l'augmentation du nombre de macrophages dans le SNC.

### **L'origine anatomique de l'infiltration du cerveau chez les animaux atteints d'EAE**

Les cellules immunes infiltrantes chez les animaux Sham sont préférentiellement localisées dans le VI, les citernes ambiantes et les citernes du tractus optique. L'ensemble de ces compartiments ainsi que les structures cérébrales adjacentes semblent constituer un site particulier d'entrée des cellules immunes dans le cerveau antérieur et moyen. Nous le qualifierons alors de carrefour central. Ce sont ces mêmes espaces liquidiens qui sont infiltrés juste avant ou en parallèle de l'apparition des premiers signes cliniques chez la souris et chez le rat atteints d'EAE. En effet, nos premiers travaux montrent que les premières cellules sont observées dans le VI et les structures adjacentes telles que l'habenula, l'hippocampe, le fimbriae, également les citernes du tractus optique avec une diffusion dans la substance blanche du tractus optique chez la souris et enfin dans les citernes ambiantes. Et c'est ensuite, de ce carrefour central que les cellules immunes se disséminent rostralement et caudalement dans les stades plus tardifs de la maladie (Figure 16). Nous avons observé une atteinte de la citerne de la lame terminale, de la fissure interhémisphérique (rostralement) ainsi que des citernes interpédunculaire et quadrigéminale, des récesses latéraux du quatrième ventricule jusqu'aux structures médullaire de part et d'autre de l'area postrema. Il existe donc en plus du site de prédilection de la moelle épinière, un autre site de prédilection, situé au cœur du cerveau moyen, où les cellules infiltrant dans les phases précoces de l'EAE. Des observations concordantes ont été établies par Brown et al. (2007). Leur analyse spatio-temporelle montre que les réactions inflammatoires se produisent avant l'apparition des signes cliniques et que ces modifications observées dans le cerveau s'étendent à la moelle épinière. Les différentes structures impliquées semblent être en étroite relation avec les sites initiaux d'entrée des leucocytes, que sont les plexus choroïdes et les méninges. De plus, ils observent que les infiltrations précoces de la substance blanche par des lymphocytes T sont associées à une activation microgliale mais rarement associé à un recrutement leucocytaire au niveau vasculaire (Brown and Sawchenko, 2007).



**Figure 16 : Répartition des infiltrats au cours du temps.**

C'est à partir de ce carrefour central que va se développer l'infiltration cellulaire qui se répand ensuite dans l'ensemble du SNC : le cerveau et la moelle épinière, et l'ensemble des compartiments liquidiens. Quelle(s) caractéristique(s) particulière(s) possède ce carrefour central, qui expliquerait un tel tropisme ?

Les espaces liquidiens extraventriculaires que sont les citernes de la base, les citernes ambiantes ainsi que le VI correspondent à des poches de LCR délimitées par des membranes méningées. Elles sont le résultat d'invagination de la pie-mère et parfois même de l'arachnoïde (Sufianov et al., 2009). Le VI semble être bordé par des membranes issues de la pie-mère mais la caractérisation exacte de ces membranes n'est pas établie. En particulier, les caractéristiques phénotypiques, telles que la présence de **molécules d'adhésion ou d'intégrines** pourrait favoriser l'ancrage d'un type particulier de cellules immunes aux membranes de ces citernes. Le phénotype de ces différentes membranes pourrait expliquer la présence de certaines cellules notamment les macrophages et les lymphocytes chez les animaux EAE alors que les neutrophiles sont principalement retrouvés circulant dans le LCR.

Le tropisme des espaces liquidiens extraventriculaires pour les cellules immunes sanguines pourrait également être le résultat de la présence d'un type particulier de **cellules résidentes**. Chez nos animaux contrôles, les cellules présentes dans ces espaces sont des cellules myéloïdes. La nécessité d'une restimulation des lymphocytes activés en périphérie par des CPA dans le SNC expliquerait la présence de **cellules myéloïdes** résidentes dans ces citernes ainsi que l'infiltration précoce de ces espaces. L'hypothèse de la présence de CPA dans ces espaces est confortée par l'identification de **cellules dendritiques** au sein des espaces sous-arachnoïdiens ainsi que des macrophages pouvant également présenter l'antigène aux lymphocytes T. La fonction de présentation antigénique des cellules myéloïdes présentes à la surface apicale des plexus choroïdes, appelées cellules de Kolmer, n'est pas clairement identifiée (McMenamin et al., 2003). Quant aux quelques cellules dendritiques du stroma des plexus choroïdes, elles ne sont pas en contact direct avec le LCR et donc avec les antigènes cérébraux solubles. Par ailleurs, la présence de cellules résidentes dans ces espaces pourrait faciliter le recrutement d'autres leucocytes, non pas par une présentation antigénique, mais par la synthèse de molécules immuno-actives. Il a été montré que des mastocytes sont présents dans le VI chez le rat (Stanley et al., 1990; Yang et al., 1999) ainsi qu'à la surface de la dure-mère et de la pie-mère et non dans le parenchyme (Stanley et al., 1990). Ces cellules ont été impliquées dans la physiopathogénèse de l'EAE en favorisant l'infiltration et la réactivation des lymphocytes T ainsi que des neutrophiles via la sécrétion de TNF (Stanley et al., 1990).

Enfin, le point commun à toutes ces structures formant le carrefour central est le contact direct avec le LCR, qu'il soit ventriculaire ou extraventriculaire. Le flux de LCR est rapide dans le système ventriculaire ce qui pourrait expliquer que peu de cellules sont visibles dans le LCR ou même attaché à l'épendyme. Par contre, en ce qui concerne les citernes et le VI, le flux de LCR dans ces compartiments est moindre. De nombreuses membranes traversent ces espaces et peuvent être par conséquent des zones d'ancrage des leucocytes. Ces citernes et velums internes comprennent les plus grands volumes de LCR, alors qu'à la surface du cortex et autour de la moelle épinière, les espaces sont beaucoup plus restreints et la quantité de LCR circulant est donc plus faible, voir négligeable. Ceci est à mettre en parallèle avec l'absence d'infiltrats dans le parenchyme sous-pial à la surface du cortex cérébral.

De ces différentes analyses, nous avons montré le rôle prépondérant du LCR dans l'orchestration de la distribution des cellules immunes dans les phases précoces de l'EAE. Le



LCR pourrait être un simple système de transport des cellules immunes et dans ce cas, il est nécessaire de définir quelle(s) voie(s) de passage les cellules immunes empruntent pour se retrouver dans le LCR.

Par ailleurs, le LCR pourrait également être le lien entre le système immunitaire et le SNC. En effet, il pourrait servir de moyen de communication en transportant des médiateurs moléculaires qui favoriseraient le recrutement des cellules immunes. Dans cette hypothèse, il est donc intéressant de connaître les molécules immunomodulatrices présentes dans le LCR mais également qu'elle(s) est (sont) la(les) source(s) de ces molécules ?

Nous allons donc discuter ces deux points plus précisément dans les paragraphes suivants.

### **Les différentes voies d'entrées empruntées par les cellules immunes pour atteindre le LCR**

Nous avons montré chez nos animaux EAE que les espaces sous-arachnoïdiens, tels que les citernes de la base, les velums et les citernes internes sont des sites préférentiels d'accumulation des cellules immunes dès les phases précoces de la maladie. Aucune infiltration autour des vaisseaux profonds du parenchyme cérébral n'est observée. Les citernes et velums contiennent des nombreuses artères et veines, ces dernières pouvant être la voie d'entrée des cellules immunes. La région du VI ainsi que la région du chiasma optique sont des points de pénétration, départ, des principales artères/veines irriguant le cerveau. En effet, les veines cérébrales internes sont en étroite relation avec le VI et rejoignent ensuite la veine de Galen (Chen et al., 1998). Dans le cas d'une voie d'entrée des leucocytes à travers la paroi de ces veines, le mécanisme de migration déterminé pour les veinules post-capillaires serait étendu aux veines de calibre plus important. L'hypothèse d'une voie d'entrée des cellules immunes au niveau des vaisseaux méningés a également été proposée par Bartholomaeus et al. (2009). Chez le rat après un transfert adoptif, les premiers lymphocytes T migrent dans le SNC au travers des vaisseaux piaux de la moelle épinière. Cependant, l'ensemble des vaisseaux pénétrant dans le SNC, acquiert un phénotype serré dès le passage de l'arachnoïde (Cassella et al., 1996; Nag et al., 2007). Comment expliquer la différence de migration observée au niveau des vaisseaux méningés comparés aux vaisseaux parenchymateux ? En ce qui concerne les protéines de jonctions serrées, aucune différence d'expression n'a été décrite. L'occludine et la claudine 5 sont exprimées par les vaisseaux du parenchyme ainsi que par les

vaisseaux piaux (Nag et al., 2007). Basé sur des études *in vitro*, il a été suggéré que la présence de pied astrocytaire autour des vaisseaux parenchymateux renforce les propriétés de barrière, ce qui pourrait expliquer l'absence d'infiltrats dans le parenchyme dans les phases précoces de l'EAE, lorsque les cellules endothéliales ne sont pas encore activées. Le niveau d'activation des cellules endothéliales semble important dans le déclenchement des étapes de migration. En effet, Piccio montre que l'extravasation des lymphocytes n'est possible que lorsque l'endothélium des vaisseaux piaux cérébraux est activé (Piccio et al., 2002). Le passage préférentiel des cellules immunes au niveau des vaisseaux des espaces liquidiens suggère qu'il existerait des seuils d'activation des cellules endothéliales différents entre les vaisseaux du parenchyme et ceux des méninges. Il pourrait s'agir d'un nombre de récepteurs aux cytokines plus élevé dans l'endothélium méningé ou encore une expression constitutive de molécules d'adhésion spécifique des vaisseaux méningés. Mais des études complémentaires sont nécessaires afin d'évaluer le bienfondé de ces hypothèses. Cependant, l'activation des vaisseaux méningés peut être facilitée par la présence spécifique à la surface des vaisseaux méningés de TLR. Le *Mycobacterium tuberculosis* présent dans l'adjuvant, peut être reconnu par les TLR 2, 4 et 9 (Kleinnijenhuis et al., 2011). En effet, il a été montré que les leptoméninges de rat possèdent des cellules positives pour le gène CD14 et TLR4, tous deux impliqués dans la réponse au lipopolysaccharide (Laflamme and Rivest, 2001). Il a également été montré que 10 jours après une immunisation contre la MOG chez la souris C57BL/6, les méninges expriment le TLR2 (Zekki et al., 2002). Cependant, la localisation précise de TLR2 au niveau des membranes arachnoïdiennes, piales ou au niveau des vaisseaux méningés n'est pas connue. Les plexus choroïdes quant à eux semblent exprimer constitutivement le TLR2 (Laflamme and Rivest, 2001) et le surexpriment après une EAE (Zekki et al., 2002). L'activation de ces TLR par le *Mycobacterium tuberculosis* entraînerait la sécrétion de cytokines et de chimiokines, telles que CCL2 (Thibeault et al., 2001), favorisant par la suite le recrutement de cellules immunes.

Ces différents mécanismes détaillés précédemment ne permettent pas d'expliquer la localisation des infiltrats périventriculaires observés chez les animaux EAE. En effet, les cellules immunes présentent dans le corps calleux chez la souris, en position sous-épendymaire du 3V dorsal ou du VL, et dans l'angle supérieur du VL, ainsi que dans l'alveus hippocampal semblent provenir du LCR ventriculaire. Une voie possible d'entrée de ces cellules est les plexus choroïdes. Les mécanismes de passage au niveau des plexus choroïdes ont été peu étudiés. Une étude a suggérée un passage de l'épithélium via l'interaction de

CCR6 à la surface des lymphocytes, avec CCL20 qui est exprimé par l'épithélium choroïdien. Ce mécanisme serait spécifique aux lymphocytes Th17, car tous les leucocytes n'expriment pas CCR6 (Reboldi et al., 2009). Dans les phases précoces de la maladie, les leucocytes emprunteraient la voie de passage, décrite au cours de la surveillance neuro-immunitaire (Kivisäkk et al., 2003; Reboldi et al., 2009). Un argument supplémentaire en faveur d'un passage par les plexus choroïdes est la présence de cellules immunes dans le stroma. Dans le cas d'inflammation périphérique induite par une enterotoxine, les cellules immunes s'accumulent dans le stroma (Petito and Adkins, 2005), alors que dans nos modèles EAE, aucune accumulation n'est visible, seulement une légère augmentation du nombre de lymphocytes T chez la souris. Cette absence d'accumulation s'expliquerait par la nécessité des cellules primées pour un antigène central d'atteindre leur cible. Dans ce schéma, les plexus choroïdes seraient une voie de passage et non un site d'accumulation.

Nous avons recherché l'expression spécifique de molécules d'adhésion par les cellules des plexus choroïdes afin de déterminer les mécanismes pouvant régir le passage des cellules. Les résultats ont révélés l'expression spécifiques de deux molécules, ITGB5 et ITGB6. Les intégrines sont les récepteurs des protéines de la matrice extracellulaire. Le ligand d'ITGB5 est la vitronectine (Smith et al., 1990) alors que le ligand d'ITGB6 est la fibronectine. La présence de ces intégrines dans les plexus choroïdes (Gabrion et al., 1988) peut permettre l'ancrage des cellules épithéliales à la lame basale. Cependant, des études ont montré que ces intégrines sont impliquées dans la migration des cellules tumorales (Hazelbag et al., 2007) et que par ailleurs certaines cellules immunes expriment également ces intégrines, notamment les macrophages et la microglie. Il a été montré au cours de l'EAE que la vitronectine et la fibronectine issu du sang, se déposent dans le parenchyme après altération de la BHE et par conséquent active la microglie qui possède l'ITGB5. L'activation de la microglie se caractérise par la sécrétion de MMP-9 qui favorise la dégradation de la myéline (Milner et al., 2007). Dans le cadre de l'EAE, les macrophages ou autres leucocytes exprimant ces intégrines pourraient entrer en compétition avec les cellules épithéliales choroïdiennes liées à la matrice extracellulaire. Cette compétition entrainerait une désorganisation de l'épithélium choroïdien et favoriserait ainsi le passage des leucocytes dans le LCR.

Enfin, une autre voie d'entrée a été suggérée, au niveau des OCV qui partagent des caractéristiques similaires aux plexus choroïdes, telles que les vaisseaux fenêtrés et la présence d'épithélium à jonctions serrées bordant le LCR. Cette hypothèse est basée sur les travaux menés par le groupe de B. Engelhardt qui a montré une augmentation du nombre de

cellules immunes au sein de certain OCV au cours de l'EAE chez la souris (Schulz and Engelhardt, 2005). Chez nos animaux EAE, de nombreuses cellules immunes sont retrouvées dans les structures adjacentes au SFO, à l'EM et à l'AP. Une pénétration des cellules immunes via les OCV reste donc envisageable mais la présence de tanocytes limite le passage du sang au LCR et la présence de type cellulaire particulier autour des OCV limite le passage des cellules du sang vers le parenchyme cérébral. De plus, la surface d'échange que représentent les OCV est bien inférieure à la surface développée des plexus choroïdes. Les OCV ne semblent donc pas une voie d'entrée majoritaire des cellules immunes dans le SNC.

Nous pouvons conclure des ces différentes données que les différentes régions où sont retrouvées les infiltrats ont toutes en commun la caractéristique d'être au contact du LCR. La théorie de l'implication du système plexus choroïdes-LCR ne remet pas en question les mécanismes de migration au niveau des cellules endothéliales formant la BHE activée, déjà très largement étudiés, mais suggèrent d'autres mécanismes, notamment dans les phases précoces de la maladie. Au cours de l'analyse des phases précoces de l'EAE, nos résultats montrent que seuls les vaisseaux sanguins parenchymateux à proximité d'un compartiment liquidien sont infiltrés par des cellules immunes et non les vaisseaux profonds du parenchyme. Les cellules immunes infiltrent donc le parenchyme le long des espaces périvasculaires des vaisseaux proches des compartiments liquidiens. Les cellules immunes sont également disséminées dans le parenchyme en suivant un gradient à partir du LCR vers le parenchyme. Ces deux observations suggèrent que le LCR présent dans les citernes, les espaces sous-arachnoïdiens et les espaces périvasculaires pénétrants, est composée de molécules attractrices pour les cellules immunes, ou stimulatrices des vaisseaux qui sont à proximité du compartiment liquidien. Les effecteurs qui pourraient expliquer l'attraction des cellules immunes sont les chimiokines.

### **Les plexus choroïdes sont une source de chimiokines qui orientent la distribution des cellules immunes.**

Nos résultats d'identification des molécules immuno-actives dans le LCR des rats contrôles DA révèlent la présence de CCL2, CCL5, CXCL10 et CXCL1 à un niveau basal, signifiant une sécrétion constitutive de ces molécules dans le LCR. Ces observations sont complétées

par l'analyse plus large que nous avons menée sur le LCR des rats Sprague-Dawley contrôles. Cette dernière étude révèle également une nette expression constitutive de CXCL2, CXCL5 et CCL5 dans le LCR.

Peu d'études ont été réalisées afin de définir le rôle des chimiokines sécrétées dans le LCR constitutivement. Par conséquent il est difficile de conclure à une action précise de chaque molécule observée. Cependant, une étude chez le rat a montré que le renouvellement des macrophages périvasculaires et méningés est dépendant de l'expression de CCL2 et de son récepteur, CCR2, puisqu'une absence de renouvellement des macrophages est observée chez des souris double-déficientes en CCL2 et CCR2 (Schilling et al., 2009). Cependant, il semble que les cellules immunes répondent à un ensemble de chimiokines plutôt qu'à l'action d'une chimiokine. En effet, le renouvellement des macrophages périvasculaires est maintenu chez des souris déficientes uniquement pour CCL2 ou CCR2 (Schilling et al., 2009). Il existerait donc des phénomènes compensatoires, dus aux superpositions d'interactions entre les chimiokines et leurs récepteurs relatifs. Une chimiokine peut se lier à divers récepteurs et un récepteur peut être activé par plusieurs chimiokines. En effet, CCL5 peut être un chemoattractant des macrophages via CCR2 mais avec une affinité plus faible que CCL2 (Semple et al., 2010). Les chimiokines CXCL1 et CXCL2 sont principalement reconnues comme étant des molécules attractrices des neutrophiles (Szmydynger-Chodobska et al., 2009) mais leur rôle dans la surveillance neuro-immunitaire n'est pas défini. La chimiokine CCL5 est également retrouvée constitutivement dans le LCR des animaux. Ceci est en accord avec les lymphocytes, type leucocytaire majoritairement retrouvés dans le LCR de ces mêmes animaux.

Au cours de réactions inflammatoires, telle que l'EAE ou après un traitement à l'IL-1 $\beta$ , les taux de chimiokines dans le LCR augmentent. Les sources de sécrétions de ces chimiokines peuvent être, d'une part les cellules immunes ayant infiltrées le cerveau ou résidentes (Hanisch, 2002) et d'autre part, des cellules du SNC, telles que les astrocytes (Huang et al., 2000), l'épendyme ou les plexus choroïdes (Szmydynger-Chodobska et al., 2009; Szmydynger-Chodobska et al., 2011).

Afin de comprendre l'implication des plexus choroïdes dans le recrutement précoce et dans la migration des cellules immunes du sang vers le SNC, nous avons comparé le profil de chimiokines sécrétées par les cellules épithéliales en culture au profil de chimiokines retrouvées dans le LCR.

Nos résultats montrent que les cellules épithéliales choroïdiennes en culture sécrètent constitutivement de nombreuses chimiokines et que cette capacité de sécrétion est augmentée après un traitement à l'IL-1 $\beta$ . En particulier, CXCL1, CXCL3, CXCL5 et CCL20 sont fortement sécrétées par l'épithélium choroïdien en culture. Ce dernier est donc une source probable de ces chimiokines retrouvées dans le LCR des animaux traités à l'IL-1 $\beta$ . Par contre, les taux de CXCL2 et CCL3 sont fortement augmentés dans le LCR, et peu dans les surnageants cellulaires. Ceci signifie que les plexus choroïdes sont une source mineure de ces chimiokines dans le LCR des animaux traités à l'IL-1 $\beta$ . Les astrocytes présents en très grand nombre dans le SNC pourraient être une source majeure de CXCL2. Des études ont montré que des astrocytes en culture sécrètent différents membres de la famille CXC, notamment CXCL2 (Wang et al., 2007) ainsi que les membres de la famille CC, tels que CCL3 (Guo et al., 1998) après un stimulus inflammatoire.

Nos données montrent que les plexus choroïdes répondent rapidement à une exposition à de l'IL-1 $\beta$ , même à des doses très faibles. Ceci suggère que les plexus choroïdes ont un rôle dans les phases précoces des pathologies. En effet, l'augmentation des taux d'IL-1 $\beta$  dans le SNC est souvent observée dans de nombreuses pathologies, telles que le traumatisme cérébral (Goodman et al., 2008) et l'ischémie (Zhu et al., 2006). La réponse rapide des plexus choroïdes à l'IL-1 $\beta$  est due à la présence de nombreux récepteurs à la surface apicale des cellules épithéliales (French et al., 1999; Konsman et al., 2004).

L'analyse des chimiokines présentes dans le LCR des rats EAE permettent d'expliquer la présence de nombreux types cellulaires dans les infiltrats. En effet, CCL2, CCL5 et CXCL10 sont connus pour être responsables du recrutement des monocytes et des lymphocytes. La présence de CXCL1 est corroborée par le nombre important de neutrophiles retrouvés dans le LCR de ces animaux. Les différentes chimiokines retrouvées dans le LCR peuvent également être synthétisées par les cellules infiltrantes, elles-mêmes, induisant ainsi une stimulation paracrine.

L'ensemble de ces données suggère que les plexus choroïdes ont un rôle dans les phases précoces de la maladie soit en favorisant le recrutement des différents types de cellules immunes, soit en orientant leur distribution au sein du SNC via la sécrétion de chimiokines.

## **L'Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale : un modèle adapté à l'étude de la sclérose en plaque ... ?**

Il est évident qu'il n'est pas possible de récapituler l'ensemble des caractéristiques de la SEP au sein d'un seul modèle animal, la première raison étant l'importante différence temporelle entre la pathologie humaine se développant sur plusieurs décades et l'EAE se manifestant sur quelques semaines seulement.

Cependant des similarités sont retrouvées entre le modèle animal et la SEP. Nous avons montré dans deux modèles animaux que les infiltrats de cellules immunes sont préférentiellement localisés dans les structures cérébrales adjacentes au LCR, notamment certaines zones périventriculaires. Les nombreux infiltrats retrouvés au sein du cerveau moyen et antérieur évoquent un site privilégié d'infiltration leucocytaire, supplémentaire à celui de la moelle épinière déjà établi. L'atteinte du cerveau est également une caractéristique de la SEP, puisque les zones périventriculaires et sous-piales sont préférentiellement le siège de démyélinisation et d'inflammation.

Les compartiments extraventriculaires, que sont les citernes et velums, sont particulièrement impliqués dans la pathogénèse de l'EAE. Ces espaces chez l'homme existent également mais n'ont pas fait l'objet d'études spécifiques. L'implication du LCR dans la distribution des effecteurs immuns au cours d'inflammations centrales ainsi que la grande capacité volumique des citernes chez l'homme appellent à des études complémentaires visant à comprendre le rôle des espaces liquidiens dans la pathogénèse de la SEP.

L'implication des plexus choroïdes n'a jusqu'à maintenant jamais été montrée dans les phases précoces de la SEP. En effet, les études histologiques chez l'homme ne sont possibles que post-mortem, ce qui limite les analyses du développement de la maladie. Une seule étude réalisée post-mortem chez l'homme montre un nombre important de cellules immunes dans les plexus choroïdes (Vercellino et al., 2008). Peu de données existent également concernant l'expression de molécules d'adhésion et de chimiokines dans le plexus choroïdes humains, à l'exception de la mise en évidence de CCL20 et la P-sélectine dans ce tissu (Ransohoff et al., 2003; Reboldi et al., 2009).

Une deuxième similitude existe entre le modèle animal et la SEP. Nous avons montré la présence de lymphocytes B infiltrant le SNC des souris EAE, notamment leur localisation particulière restreinte aux espaces liquidiens extraventriculaires. Contrairement aux autres



types cellulaires étudiés, les lymphocytes B ne pénètrent que très peu dans le parenchyme cérébral. Cette caractéristique a été décrite également chez l'homme (Serafini et al., 2004), par une étude immunohistochimique révélant la présence de follicules contenant des lymphocytes B prolifératifs et un réseau de cellules dendritiques dans les méninges de patients atteints de SEP. Lovato *et al.* montrent également que de nombreux follicules de lymphocytes B sont retrouvés dans les sulci méningés uniquement et non dans le parenchyme (Lovato et al., 2011). Une chimiokine pourrait favoriser cette localisation. En effet, il a été montré que la formation des follicules ectopiques nécessite la présence des cellules dendritiques sécrétant la chimiokine CX3CL1. Les méninges semblent être le lieu de prédilection des cellules dendritiques, d'où elles captent l'antigène cérébral et peuvent ensuite le présenter aux différentes cellules circulantes pénétrant dans le cerveau. L'activation des cellules dendritiques entraîne la sécrétion de CXCL13 attirant ainsi les lymphocytes B (Magliozzi et al., 2004).

Enfin, la théorie qu'un agent infectieux puisse agir en tant que facteur déclenchant non spécifique de la SEP, a souvent été rapporté. De façon intéressante, les modèles animaux requièrent l'action d'adjuvants et de toxines pour développer l'EAE. Ces adjuvants non spécifiques du SNC agissent en périphérie pour stimuler la réponse inflammatoire et favorisent les étapes d'extravasation au niveau des monocouches cellulaires formant les interfaces sang-cerveau. Chez l'homme, les mécanismes par lesquels ces agents infectieux seraient impliqués dans la physiopathogénèse reste à déterminer. Deux hypothèses sont proposées : le mimétisme des antigènes du soi ou une action au niveau central de l'agent infectieux.

Malgré les similitudes entre le modèle animal et la SEP, certaines caractéristiques restent cependant éloignées.

En particulier, parmi les différents types cellulaires composant les infiltrats chez les animaux EAE, les neutrophiles correspondent au troisième type majoritaire et ceci plus particulièrement chez les souris. De plus, les neutrophiles sont le deuxième type cellulaire présents dans le LCR des rats EAE. Ces observations ne sont pas retrouvées chez l'homme (Chabas et al., 2010), au contraire, la présence de neutrophiles dans le LCR humain oriente le diagnostic vers une pathologie infectieuse. L'intervention des neutrophiles dans la pathologie de l'EAE peut-être le résultat de l'utilisation d'adjuvant et notamment de la toxine pertussis, un antigène stimulant la réponse immune innée dont les principaux effecteurs sont les macrophages et les neutrophiles.



Enfin, les études déterminant les types cellulaires acteurs de la pathologie de la SEP, révèle la présence de lymphocytes CD8<sup>+</sup> (Friese and Fugger, 2009). Ce sous-type de lymphocytes est très peu retrouvé dans nos modèles animaux, en raison du mode d'induction utilisé qui oriente la réponse immune vers une réponse de type CD4<sup>+</sup>. Cependant certains modèles sont caractérisés par la présence de lymphocytes CD8<sup>+</sup>. Par ailleurs, nous avons mené une analyse des phases précoces de l'EAE et les études menées chez l'homme correspondent aux phases tardives de la SEP. Il pourrait exister une inversion des effecteurs immunitaire en fonction du temps. En effet, une étude chez la souris a montré que les lymphocytes CD4<sup>+</sup> contribueraient à l'induction de la maladie alors que les lymphocytes CD8<sup>+</sup> auraient un rôle régulateur dans les phases plus tardives (Sonobe et al., 2007)

# CONCLUSIONS & PERSPECTIVES



Ces différentes études ont permis de montrer que le système plexus choroïde-LCR orchestre la distribution des différents effecteurs immunitaires dans les phases précoces de l'inflammation cérébrale.

Le LCR peut être défini comme un système de transmission des informations provenant des plexus choroïdes, et de distribution des cellules infiltrantes, permettant une communication rapide avec d'autres structures notamment les méninges, sites important de recrutement d'autres cellules immunes.

Nous avons établi l'implication des espaces liquidiens, notamment extraventriculaires, dans la distribution des cellules immunes dans le SNC au cours de l'EAE. Certaines molécules d'adhésion spécifiques des membranes de ces citernes et velums pourraient expliquer la présence des cellules immunes dans ces espaces. La caractérisation du phénotype des membranes ainsi que des vaisseaux composant ces espaces est à déterminer. Une analyse des membranes isolées de cerveaux d'animaux sains et EAE par PCR, permettrait une première identification de molécules d'adhésion.

Nous avons également montré que les plexus choroïdes et les vaisseaux des espaces liquidiens extraventriculaires peuvent être des voies d'entrée des cellules immunes dans les phases précoces de l'EAE. Cependant cela n'indique pas s'il s'agit de voies d'entrée pour l'ensemble des cellules infiltrantes ou s'il s'agit de voies d'entrées pour quelques cellules spécifiques qui se multiplieraient après avoir atteint leur cible. L'étude de marqueur de prolifération, tel que le Ki67 permettrait de définir le taux de prolifération des cellules immunes.

Les plexus choroïdes expriment constitutivement des molécules d'adhésion, et des chimiokines qui pourraient favoriser le passage de cellules immunes dans le LCR en conditions physiologiques. L'absence de variation d'expression de ces molécules entre les animaux Sham et EAE peut être due à une absence de modification au cours d'inflammation (périphérique ou centrale) par rapport aux conditions physiologiques, ou peut être due à une augmentation d'expression engendrée par une inflammation périphérique. Dans ce dernier cas, l'antigène central n'aurait pas d'effet supplémentaire à l'inflammation périphérique. Il est donc nécessaire d'approfondir ces analyses, en étudiant l'expression de ces molécules dans des échantillons d'animaux contrôles. Ceci permettra de définir, les variations d'expression des molécules entre des conditions physiologiques et inflammatoires, périphériques ou centrales. Les variations potentiellement obtenues par PCR quantitative pourront être confortées par une étude de l'expression protéique par une analyse biochimique. D'autres

molécules d'adhésion pourront également être recherchées sur l'épithélium choroïdien, notamment EVA (Epithelial V-like Antigen) dont l'expression par des cellules épithéliales choroïdiennes humaines pourrait réguler l'adhésion de lymphocytes T CD4<sup>+</sup> (Wojcik et al., 2011). L'expression des différentes molécules d'adhésion sélectionnées d'après l'analyse PCR, telles que les intégrines beta 5 et beta 6, pourrait être étudiée par immunohistochimie afin de localiser précisément ces protéines au sein des plexus choroïdes. Par ailleurs, l'implication de ces molécules dans la migration des cellules immunes pourra être évaluée, à l'aide du modèle cellulaire de la barrière sang-liquide céphalorachidien. Des études de migration de leucocytes pourront être réalisées en présence ou non d'anticorps bloquant de ces intégrines. Enfin, l'expression de ces protéines par l'épithélium choroïdien humain sera également à étudier, sur des prélèvements issus de patients sains ou atteints d'inflammation centrale.

L'ensemble de ce travail a également identifié le mécanisme permettant aux plexus choroïdes d'orienter l'infiltration leucocytaire. Il s'agit de la capacité sécrétoire des plexus choroïdes. Nous avons montré que l'épithélium choroïdien sécrète constitutivement des chimiokines, dont le rôle dans la surveillance neuro-immunitaire reste encore à définir. En conditions pathologiques, les plexus choroïdes répondent très rapidement à de faibles doses de cytokines. Des prélèvements de LCR effectués au cours des jours précédant les premiers signes cliniques, aideraient à l'identification des premiers acteurs immunitaires dans la physiopathogénèse de l'EAE.

Les chimiokines sécrétées dans le LCR, au cours de l'EAE ou après un traitement cytokinique, définissent les types cellulaires intervenant dans la physiopathogénèse. Il pourrait exister des variations d'expression de ces chimiokines au cours de la maladie qui induirait des variations des proportions relatives des sous-types leucocytaires en fonction de l'évolution de la maladie. Chez l'homme, une connaissance plus précise des concentrations en chimiokines dans le LCR ainsi que des types de cellules immunes intervenant dans une phase donnée de la maladie, rechute ou rémission, permettrait un traitement plus ciblé des patients selon le stade de la maladie.

# BIBLIOGRAPHIE

- 't Hart, B.A., Massacesi, L., 2009. Clinical, pathological, and immunologic aspects of the multiple sclerosis model in common marmosets (*Callithrix jacchus*). *J Neuropathol Exp Neurol.* 68, 341-55.
- Agrawal, S., Anderson, P., Durbeej, M., van Rooijen, N., Ivars, F., Opdenakker, G., Sorokin, L.M., 2006. Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 203, 1007-19.
- Allt, G., Lawrenson, J.G., 1997. Is the pial microvessel a good model for blood-brain barrier studies? *Brain Res Brain Res Rev.* 24, 67-76.
- Almolda, B., González, B., Castellano, B., 2010. Activated microglial cells acquire an immature dendritic cell phenotype and may terminate the immune response in an acute model of EAE. *J Neuroimmunol.* 223, 39-54.
- Arens, R., Schoenberger, S.P., 2010. Plasticity in programming of effector and memory CD8 T-cell formation. *Immunol Rev.* 235, 190-205.
- Arnhold, J., Flemmig, J., 2010. Human myeloperoxidase in innate and acquired immunity. *Arch Biochem Biophys.* 500, 92-106.
- Banchereau, J., Briere, F., Caux, C., Davoust, J., Lebecque, S., Liu, Y.J., Pulendran, B., Palucka, K., 2000. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol.* 18, 767-811.
- Bartholomäus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schläger, C., Miljkovic, D., Ellwart, J.W., Klinkert, W.E.F., Flügel-Koch, C., Issekutz, T.B., Wekerle, H., Flügel, A., 2009. Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature.* 462, 94-8.
- Batoulis, H., Addicks, K., Kuerten, S., 2010. Emerging concepts in autoimmune encephalomyelitis beyond the CD4/T(H)1 paradigm. *Ann Anat.* 192, 179-93.
- Baxter, A.G., 2007. The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol.* 7, 904-12.
- Bechmann, I., Mor, G., Nilsen, J., Eliza, M., Nitsch, R., Naftolin, F., 1999. FasL (CD95L, Apo1L) is expressed in the normal rat and human brain: evidence for the existence of an immunological brain barrier. *Glia.* 27, 62-74.
- Bechmann, I., Galea, I., Perry, V.H., 2007. What is the blood-brain barrier (not)? *Trends Immunol.* 28, 5-11.
- Berard, J.L., Wolak, K., Fournier, S., David, S., 2010. Characterization of relapsing-remitting and chronic forms of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Glia.* 58, 434-45.
- Berg, R.E., Cordes, C.J., Forman, J., 2002. Contribution of CD8+ T cells to innate immunity: IFN-gamma secretion induced by IL-12 and IL-18. *Eur J Immunol.* 32, 2807-16.
- Bernard, C.C., Johns, T.G., Slavin, A., Ichikawa, M., Ewing, C., Liu, J., Bettadapura, J., 1997. Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis. *J Mol Med.* 75, 77-88.
- Bettelli, E., Oukka, M., Kuchroo, V.K., 2007. T(H)-17 cells in the circle of immunity and autoimmunity. *Nat Immunol.* 8, 345-50.
- Blair, P.A., Chavez-Rueda, K.A., Evans, J.G., Shlomchik, M.J., Eddaoudi, A., Isenberg, D.A., Ehrenstein, M.R., Mauri, C., 2009. Selective targeting of B cells with agonistic anti-CD40 is an efficacious strategy for the generation of induced regulatory T2-like B cells and for the suppression of lupus in MRL/lpr mice. *J Immunol.* 182, 3492-502.
- Blanchard, C., Rothenberg, M.E., 2009. Biology of the eosinophil. *Adv Immunol.* 101, 81-121.

- Bohatschek, M., Werner, A., Raivich, G., 2001. Systemic LPS injection leads to granulocyte influx into normal and injured brain: effects of ICAM-1 deficiency. *Exp Neurol*. 172, 137-52.
- Brabb, T., Goldrath, A.W., von Dassow, P., Paez, A., Liggitt, H.D., Goverman, J., 1997. Triggers of autoimmune disease in a murine TCR-transgenic model for multiple sclerosis. *J Immunol*. 159, 497-507.
- Brenner, T., Soffer, D., Shalit, M., Levi-Schaffer, F., 1994. Mast cells in experimental allergic encephalomyelitis: characterization, distribution in the CNS and in vitro activation by myelin basic protein and neuropeptides. *J Neurol Sci*. 122, 210-3.
- Brok, H.P., Bauer, J., Jonker, M., Blezer, E., Amor, S., Bontrop, R.E., Laman, J.D., 't Hart, B.A., 2001. Non-human primate models of multiple sclerosis. *Immunol Rev*. 183, 173-85.
- Brooks, T.A., Ocheltree, S.M., Seelbach, M.J., Charles, R.A., Nametz, N., Egleton, R.D., Davis, T.P., 2006. Biphasic cytoarchitecture and functional changes in the BBB induced by chronic inflammatory pain. *Brain Res*. 1120, 172-82.
- Brown, D.A., Sawchenko, P.E., 2007. Time course and distribution of inflammatory and neurodegenerative events suggest structural bases for the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Comp Neurol*. 502, 236-60.
- Brown, P.D., Davies, S.L., Speake, T., Millar, I.D., 2004. Molecular mechanisms of cerebrospinal fluid production. *Neuroscience*. 129, 957-70.
- Butchi, N.B., Woods, T., Du, M., Morgan, T.W., Peterson, K.E., 2011. TLR7 and TLR9 trigger distinct neuroinflammatory responses in the CNS. *Am J Pathol*. 179, 783-94.
- Bynoe, M.S., Bonorino, P., Viret, C., 2007. Control of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4<sup>+</sup> suppressor T cells: peripheral versus in situ immunoregulation. *J Neuroimmunol*. 191, 61-9.
- Carman, C.V., Springer, T.A., 2004. A transmigratory cup in leukocyte diapedesis both through individual vascular endothelial cells and between them. *J Cell Biol*. 167, 377-88.
- Carpenter, M., Core Text of Neuroanatomy.
- Carrithers, M.D., Visintin, I., Kang, S.J., Janeway, C.A., 2000. Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain*. 123 ( Pt 6), 1092-101.
- Carrithers, M.D., Visintin, I., Viret, C., Janeway, C.S., 2002. Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system. *J Neuroimmunol*. 129, 51-7.
- Cassella, J.P., Lawrenson, J.G., Allt, G., Firth, J.A., 1996. Ontogeny of four blood-brain barrier markers: an immunocytochemical comparison of pial and cerebral cortical microvessels. *J Anat*. 189 ( Pt 2), 407-15.
- Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J.L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A.S., Kreymborg, K., Krug, S., Moumdjian, R., Bouthillier, A., Becher, B., Arbour, N., David, S., Stanimirovic, D., Prat, A., 2008. Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol*. 9, 137-45.
- Chabas, D., Ness, J., Belman, A., Yeh, E.A., Kuntz, N., Gorman, M.P., Strober, J.B., De Kouchkovsky, I., McCulloch, C., Chitnis, T., Rodriguez, M., Weinstock-Guttman, B., Krupp, L.B., Waubant, E., 2010. Younger children with MS have a distinct CSF inflammatory profile at disease onset. *Neurology*. 74, 399-405.
- Charo, I.F., Ransohoff, R.M., 2006. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 354, 610-21.



- Chen, C.Y., Chen, F.H., Lee, C.C., Lee, K.W., Hsiao, H.S., 1998. Sonographic characteristics of the cavum velum interpositum. *AJNR Am J Neuroradiol.* 19, 1631-5.
- Chen, M.-L., Yan, B.-S., Bando, Y., Kuchroo, V.K., Weiner, H.L., 2008. Latency-associated peptide identifies a novel CD4+CD25+ regulatory T cell subset with TGFbeta-mediated function and enhanced suppression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 180, 7327-37.
- Chen, Y., Kuchroo, V.K., Inobe, J., Hafler, D.A., Weiner, H.L., 1994. Regulatory T cell clones induced by oral tolerance: suppression of autoimmune encephalomyelitis. *Science.* 265, 1237-40.
- Chodobski, A., Szmydynger-Chodobska, J., 2001. Choroid plexus: target for polypeptides and site of their synthesis. *Microsc Res Tech.* 52, 65-82.
- Coquerelle, C., Moser, M., 2010. DC subsets in positive and negative regulation of immunity. *Immunol Rev.* 234, 317-34.
- D'Mello, C., Le, T., Swain, M.G., 2009. Cerebral microglia recruit monocytes into the brain in response to tumor necrosis factoralpha signaling during peripheral organ inflammation. *J Neurosci.* 29, 2089-102.
- deLuca, L.E.S., Pikor, N.B., O'Leary, J., Galicia-Rosas, G., Ward, L.A., Defreitas, D., Finlay, T.M., Ousman, S.S., Osborne, L.R., Gommerman, J.L., 2010. Substrain differences reveal novel disease-modifying gene candidates that alter the clinical course of a rodent model of multiple sclerosis. *J Immunol.* 184, 3174-85.
- Denkinger, C.M., Denkinger, M.D., Forsthuber, T.G., 2007. Pertussis toxin-induced cytokine differentiation and clonal expansion of T cells is mediated predominantly via costimulation. *Cell Immunol.* 246, 46-54.
- Di Marco, R., Khademi, M., Wallstrom, E., Iacobaeus, E., Salvaggio, A., Caracappa, S., Papoian, R., Nicoletti, F., Olsson, T., 2001. Curative effects of recombinant human Interleukin-6 in DA rats with protracted relapsing experimental allergic encephalomyelitis. *J Neuroimmunol.* 116, 168-77.
- Dickson, P.W., Aldred, A.R., Marley, P.D., Bannister, D., Schreiber, G., 1986. Rat choroid plexus specializes in the synthesis and the secretion of transthyretin (prealbumin). Regulation of transthyretin synthesis in choroid plexus is independent from that in liver. *J Biol Chem.* 261, 3475-8.
- DiLillo, D.J., Matsushita, T., Tedder, T.F., 2010. B10 cells and regulatory B cells balance immune responses during inflammation, autoimmunity, and cancer. *Ann N Y Acad Sci.* 1183, 38-57.
- Dore-Duffy, P., 2003. Isolation and characterization of cerebral microvascular pericytes. In: *The Blood-Brain Barrier, Biology and Reserch Protocols.* Vol., S. Nag, ed.^eds. Humana Press, Toronto, pp. 549.
- Döring, A., Wild, M., Vestweber, D., Deutsch, U., Engelhardt, B., 2007. E- and P-selectin are not required for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 and SJL mice. *J Immunol.* 179, 8470-9.
- Edsbagge, M., Tisell, M., Jacobsson, L., Wikkelso, C., 2004. Spinal CSF absorption in healthy individuals. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 287, R1450-5.
- El Behi, M., Dubucquoi, S., Lefranc, D., Zéphir, H., De Seze, J., Vermersch, P., Prin, L., 2005. New insights into cell responses involved in experimental autoimmune encephalomyelitis and multiple sclerosis. *Immunol Lett.* 96, 11-26.
- Engelhardt, B., Ransohoff, R.M., 2005. The ins and outs of T-lymphocyte trafficking to the CNS: anatomical sites and molecular mechanisms. *Trends Immunol.* 26, 485-95.
- Engelhardt, B., 2006. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm.* 113, 477-85.

- Evans, D.E., Munks, M.W., Purkerson, J.M., Parker, D.C., 2000. Resting B lymphocytes as APC for naive T lymphocytes: dependence on CD40 ligand/CD40. *J Immunol.* 164, 688-97.
- Fenstermacher, J.N., T; Davies, KR, 2000. Overview of the Structure and function of the blood-brain-barrier in vivo. In: *Blood-Brain Barrier, Drug Delivery and Brain Pathology*. Vol., K.S. D, Lustig ; S, Shapira, ed.^eds. Kluwer Academic / Plenum Publishers, Israel, pp. 434.
- French, R.A., VanHoy, R.W., Chizzonite, R., Zachary, J.F., Dantzer, R., Parnet, P., Bluthé, R.M., Kelley, K.W., 1999. Expression and localization of p80 and p68 interleukin-1 receptor proteins in the brain of adult mice. *J Neuroimmunol.* 93, 194-202.
- Friese, M.A., Fugger, L., 2009. Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol.* 66, 132-41.
- Gabrion, J., Peraldi, S., Faivre-Bauman, A., Klotz, C., Ghandour, M.S., Paulin, D., Assenmacher, I., Tixier-Vidal, A., 1988. Characterization of ependymal cells in hypothalamic and choroidal primary cultures. *Neuroscience.* 24, 993-1007.
- Gazzin, S., Strazielle, N., Schmitt, C., Fevre-Montange, M., Ostrow, J.D., Tiribelli, C., Gherzi-Egea, J.-F., 2008. Differential expression of the multidrug resistance-related proteins ABCB1 and ABCG2 between blood-brain interfaces. *J Comp Neurol.* 510, 497-507.
- Gherzi-Egea, J.-F., Strazielle, N., 2002. Choroid plexus transporters for drugs and other xenobiotics. *J Drug Target.* 10, 353-7.
- Gherzi-Egea, J.F., Finnegan, W., Chen, J.L., Fenstermacher, J.D., 1996. Rapid distribution of intraventricularly administered sucrose into cerebrospinal fluid cisterns via subarachnoid velae in rat. *Neuroscience.* 75, 1271-88.
- Ginguene, C., Champier, J., Maallem, S., Strazielle, N., Jouvét, A., Fevre-Montange, M., Gherzi-Egea, J.F., 2010. P-glycoprotein (ABCB1) and breast cancer resistance protein (ABCG2) localize in the microvessels forming the blood-tumor barrier in ependymomas. *Brain Pathol.* 20, 926-35.
- Gold, R., Hartung, H.P., Toyka, K.V., 2000. Animal models for autoimmune demyelinating disorders of the nervous system. *Mol Med Today.* 6, 88-91.
- Gold, R., Linington, C., Lassmann, H., 2006. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain.* 129, 1953-71.
- González-Mariscal, L., Betanzos, A., Nava, P., Jaramillo, B.E., 2003. Tight junction proteins. *Prog Biophys Mol Biol.* 81, 1-44.
- Goodman, J.C., Van, M., Gopinath, S.P., Robertson, C.S., 2008. Pro-inflammatory and pro-apoptotic elements of the neuroinflammatory response are activated in traumatic brain injury. *Acta Neurochir Suppl.* 102, 437-9.
- Gordon, S., Taylor, P.R., 2005. Monocyte and macrophage heterogeneity. *Nat Rev Immunol.* 5, 953-64.
- Gouazé, A., 1983. *Neuroanatomie clinique*, Vol., Paris.
- Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L.P., Hood, L., Zaller, D.M., 1993. Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity. *Cell.* 72, 551-60.
- Greter, M., Heppner, F.L., Lemos, M.P., Odermatt, B.M., Goebels, N., Laufer, T., Noelle, R.J., Becher, B., 2005. Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med.* 11, 328-34.
- Gross, P.M., 1992. Circumventricular organ capillaries. *Prog Brain Res.* 91, 219-33.
- Guo, H., Jin, Y.X., Ishikawa, M., Huang, Y.M., van der Meide, P.H., Link, H., Xiao, B.G., 1998. Regulation of beta-chemokine mRNA expression in adult rat astrocytes by

- lipopolysaccharide, proinflammatory and immunoregulatory cytokines. *Scand J Immunol.* 48, 502-8.
- Haas, J., Hug, A., Viehöver, A., Fritzsching, B., Falk, C.S., Filser, A., Vetter, T., Milkova, L., Korporal, M., Fritz, B., Storch-Hagenlocher, B., Krammer, P.H., Suri-Payer, E., Wildemann, B., 2005. Reduced suppressive effect of CD4+CD25<sup>high</sup> regulatory T cells on the T cell immune response against myelin oligodendrocyte glycoprotein in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol.* 35, 3343-52.
- Hanisch, U.K., 2002. Microglia as a source and target of cytokines. *Glia.* 40, 140-55.
- Hartz, A.M.S., Bauer, B., 2011. ABC transporters in the CNS - an inventory. *Curr Pharm Biotechnol.* 12, 656-73.
- Hatterer, E., Davoust, N., Didier-Bazes, M., Vauillat, C., Malcus, C., Belin, M.-F., Nataf, S., 2006. How to drain without lymphatics? Dendritic cells migrate from the cerebrospinal fluid to the B-cell follicles of cervical lymph nodes. *Blood.* 107, 806-12.
- Hatterer, E., Touret, M., Belin, M.-F., Honnorat, J., Nataf, S., 2008. Cerebrospinal fluid dendritic cells infiltrate the brain parenchyma and target the cervical lymph nodes under neuroinflammatory conditions. *PLoS ONE.* 3, e3321.
- Hayashi, Y., Nomura, M., Yamagishi, S., Harada, S., Yamashita, J., Yamamoto, H., 1997. Induction of various blood-brain barrier properties in non-neural endothelial cells by close apposition to co-cultured astrocytes. *Glia.* 19, 13-26.
- Hazelbag, S., Kenter, G.G., Gorter, A., Dreef, E.J., Koopman, L.A., Violette, S.M., Weinreb, P.H., Fleuren, G.J., 2007. Overexpression of the alpha v beta 6 integrin in cervical squamous cell carcinoma is a prognostic factor for decreased survival. *J Pathol.* 212, 316-24.
- Hemmer, B., Archelos, J.J., Hartung, H.-P., 2002. New concepts in the immunopathogenesis of multiple sclerosis. *Nat Rev Neurosci.* 3, 291-301.
- Hickey, W.F., Kimura, H., 1988. Perivascular microglial cells of the CNS are bone marrow-derived and present antigen in vivo. *Science.* 239, 290-2.
- Hickey, W.F., 1991. Migration of hematogenous cells through the blood-brain barrier and the initiation of CNS inflammation. *Brain pathology (Zurich, Switzerland).* 1, 97-105.
- Hickey, W.F., 2001. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia.* 36, 118-24.
- Hirata, K., Ishida, T., Penta, K., Rezaee, M., Yang, E., Wohlgemuth, J., Quertermous, T., 2001. Cloning of an immunoglobulin family adhesion molecule selectively expressed by endothelial cells. *J Biol Chem.* 276, 16223-31.
- Hofstetter, H.H., Shive, C.L., Forsthuber, T.G., 2002. Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells. *J Immunol.* 169, 117-25.
- Hofstetter, H.H., Ibrahim, S.M., Koczan, D., Kruse, N., Weishaupt, A., Toyka, K.V., Gold, R., 2005. Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cell Immunol.* 237, 123-30.
- Höistad, M., Samskog, J., Jacobsen, K.X., Olsson, A., Hansson, H.-A., Brodin, E., Fuxe, K., 2005. Detection of beta-endorphin in the cerebrospinal fluid after intrastriatal microinjection into the rat brain. *Brain Res.* 1041, 167-80.
- Hu, X., Wohler, J.E., Dugger, K.J., Barnum, S.R., 2010. beta2-integrins in demyelinating disease: not adhering to the paradigm. *J Leukoc Biol.* 87, 397-403.
- Huang, D., Han, Y., Rani, M.R., Glabinski, A., Trebst, C., Sorensen, T., Tani, M., Wang, J., Chien, P., O'Bryan, S., Bielecki, B., Zhou, Z.L., Majumder, S., Ransohoff, R.M., 2000. Chemokines and chemokine receptors in inflammation of the nervous system: manifold roles and exquisite regulation. *Immunol Rev.* 177, 52-67.

- Huseby, E.S., Liggitt, D., Brabb, T., Schnabel, B., Ohlén, C., Goverman, J., 2001. A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med.* 194, 669-76.
- Issazadeh, S., Lorentzen, J.C., Mustafa, M.I., Höjeberg, B., Müssener, A., Olsson, T., 1996. Cytokines in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats: persistent mRNA expression of proinflammatory cytokines and absent expression of interleukin-10 and transforming growth factor-beta. *J Neuroimmunol.* 69, 103-15.
- Jäger, A., Kuchroo, V.K., 2010. Effector and regulatory T-cell subsets in autoimmunity and tissue inflammation. *Scand J Immunol.* 72, 173-84.
- Jeong, H.-K., Jou, I., Joe, E.-h., 2010. Systemic LPS administration induces brain inflammation but not dopaminergic neuronal death in the substantia nigra. *Exp Mol Med.* 42, 823-32.
- Jiang, H., Kashleva, H., Xu, L.X., Forman, J., Flaherty, L., Pernis, B., Braunstein, N.S., Chess, L., 1998. T cell vaccination induces T cell receptor Vbeta-specific Qa-1-restricted regulatory CD8(+) T cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 95, 4533-7.
- Kawakami, N., Flugel, A., 2010. Knocking at the brain's door: intravital two-photon imaging of autoreactive T cell interactions with CNS structures. *Semin Immunopathol.* 32, 275-87.
- Keegan, B.M., Noseworthy, J.H., 2002. Multiple sclerosis. *Annu Rev Med.* 53, 285-302.
- Keep, R.F., Jones, H.C., 1990. Cortical microvessels during brain development: a morphometric study in the rat. *Microvasc Res.* 40, 412-26.
- Kela-Madar, N., de Rosbo, N.K., Ronen, A., Mor, F., Ben-Nun, A., 2009. Autoimmune spread to myelin is associated with experimental autoimmune encephalomyelitis induced by a neuronal protein, beta-synuclein. *J Neuroimmunol.* 208, 19-29.
- Kennedy, A.D., DeLeo, F.R., 2009. Neutrophil apoptosis and the resolution of infection. *Immunol Res.* 43, 25-61.
- Kerfoot, S.M., Kubes, P., 2002. Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol.* 169, 1000-6.
- 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., Kubes, P., 2004. TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *J Immunol.* 173, 7070-7.
- Khoury, S.J., Hancock, W.W., Weiner, H.L., 1992. Oral tolerance to myelin basic protein and natural recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis are associated with downregulation of inflammatory cytokines and differential upregulation of transforming growth factor beta, interleukin 4, and prostaglandin E expression in the brain. *J Exp Med.* 176, 1355-64.
- Kida, S., Pantazis, A., Weller, R.O., 1993. CSF drains directly from the subarachnoid space into nasal lymphatics in the rat. Anatomy, histology and immunological significance. *Neuropathol Appl Neurobiol.* 19, 480-8.
- Kieseier, B.C., Hartung, H.-P., 2003. Current disease-modifying therapies in multiple sclerosis. *Semin Neurol.* 23, 133-46.
- Kivisakk, P., Mahad, D.J., Callahan, M.K., Sikora, K., Trebst, C., Tucky, B., Wujek, J., Ravid, R., Staugaitis, S.M., Lassmann, H., Ransohoff, R.M., 2004. Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann Neurol.* 55, 627-38.
- Kivisakk, P., Mahad, D.J., Callahan, M.K., Trebst, C., Tucky, B., Wei, T., Wu, L., Baekkevold, E.S., Lassmann, H., Staugaitis, S.M., Campbell, J.J., Ransohoff, R.M., 2003. Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for

- trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA*. 100, 8389-94.
- Kleinnijenhuis, J., Oosting, M., Joosten, L.A., Netea, M.G., Van Crevel, R., 2011. Innate immune recognition of *Mycobacterium tuberculosis*. *Clin Dev Immunol*. 2011, 405310.
- Koh, L., Zakharov, A., Johnston, M., 2005. Integration of the subarachnoid space and lymphatics: is it time to embrace a new concept of cerebrospinal fluid absorption? *Cerebrospinal Fluid Res*. 2, 6.
- Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., Miller, S.D., 2002. Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 169, 4712-6.
- Komiyama, Y., Nakae, S., Matsuki, T., Nambu, A., Ishigame, H., Kakuta, S., Sudo, K., Iwakura, Y., 2006. IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 177, 566-73.
- Konsman, J.P., Vignes, S., Mackerlova, L., Bristow, A., Blomqvist, A., 2004. Rat brain vascular distribution of interleukin-1 type-1 receptor immunoreactivity: relationship to patterns of inducible cyclooxygenase expression by peripheral inflammatory stimuli. *J Comp Neurol*. 472, 113-29.
- Krishnamoorthy, G., Wekerle, H., 2009. EAE: an immunologist's magic eye. *Eur J Immunol*. 39, 2031-5.
- Kuchroo, V.K., Das, M.P., Brown, J.A., Ranger, A.M., Zamvil, S.S., Sobel, R.A., Weiner, H.L., Nabavi, N., Glimcher, L.H., 1995. B7-1 and B7-2 costimulatory molecules activate differentially the Th1/Th2 developmental pathways: application to autoimmune disease therapy. *Cell*. 80, 707-18.
- Kügler, S., Böcker, K., Heusipp, G., Greune, L., Kim, K.S., Schmidt, M.A., 2007. Pertussis toxin transiently affects barrier integrity, organelle organization and transmigration of monocytes in a human brain microvascular endothelial cell barrier model. *Cell Microbiol*. 9, 619-32.
- Kutzelnigg, A., Lucchinetti, C.F., Stadelmann, C., Brück, W., Rauschka, H., Bergmann, M., Schmidbauer, M., Parisi, J.E., Lassmann, H., 2005. Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain*. 128, 2705-12.
- Laflamme, N., Rivest, S., 2001. Toll-like receptor 4: the missing link of the cerebral innate immune response triggered by circulating gram-negative bacterial cell wall components. *FASEB J*. 15, 155-163.
- Laschinger, M., Engelhardt, B., 2000. Interaction of alpha4-integrin with VCAM-1 is involved in adhesion of encephalitogenic T cell blasts to brain endothelium but not in their transendothelial migration in vitro. *J Neuroimmunol*. 102, 32-43.
- Lassmann, H., 2007. Experimental models of multiple sclerosis. *Rev Neurol (Paris)*. 163, 651-5.
- Lassmann, H., Brück, W., Lucchinetti, C.F., 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*. 17, 210-8.
- Ledeboer, A., Wierinckx, A., Bol, J.G., Floris, S., Renardel de Lavalette, C., De Vries, H.E., van den Berg, T.K., Dijkstra, C.D., Tilders, F.J., van dam, A.M., 2003. Regional and temporal expression patterns of interleukin-10, interleukin-10 receptor and adhesion molecules in the rat spinal cord during chronic relapsing EAE. *J Neuroimmunol*. 136, 94-103.
- Levine, S., 1974. Hyperacute, neutrophilic, and localized forms of experimental allergic encephalomyelitis: a review. *Acta Neuropathol*. 28, 179-89.
- Levinger, I.M., 1971. The cerebral ventricles of the rat. *J Anat*. 108, 447-51.



- Liblau, R.S., Singer, S.M., McDevitt, H.O., 1995. Th1 and Th2 CD4<sup>+</sup> T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today*. 16, 34-8.
- Ling, E.A., Kaur, C., Lu, J., 1998. Origin, nature, and some functional considerations of intraventricular macrophages, with special reference to the epiplexus cells. *Microsc Res Tech*. 41, 43-56.
- Lorentzen, J.C., Issazadeh, S., Storch, M., Mustafa, M.I., Lassman, H., Linington, C., Klareskog, L., Olsson, T., 1995. Protracted, relapsing and demyelinating experimental autoimmune encephalomyelitis in DA rats immunized with syngeneic spinal cord and incomplete Freund's adjuvant. *J Neuroimmunol*. 63, 193-205.
- Lovato, L., Willis, S.N., Rodig, S.J., Caron, T., Almendinger, S.E., Howell, O.W., Reynolds, R., O'Connor, K.C., Hafler, D.A., 2011. Related B cell clones populate the meninges and parenchyma of patients with multiple sclerosis. *Brain*. 134, 534-41.
- Lyons, J.-A., Ramsbottom, M.J., Cross, A.H., 2002. Critical role of antigen-specific antibody in experimental autoimmune encephalomyelitis induced by recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein. *Eur J Immunol*. 32, 1905-13.
- Magliozzi, R., Columba-Cabezas, S., Serafini, B., Aloisi, F., 2004. Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol*. 148, 11-23.
- Mangano, K., Nicoletti, A., Patti, F., Donia, M., Malaguarnera, L., Signorelli, S., Magro, G., Muzio, V., Greco, B., Zaratin, P., Meroni, P., Zappia, M., Nicoletti, F., 2010. Variable effects of cyclophosphamide in rodent models of experimental allergic encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol*. 159, 159-68.
- Mann, M.K., Maresz, K., Shriver, L.P., Tan, Y., Dittel, B.N., 2007. B cell regulation of CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 178, 3447-56.
- Markovic-Plese, S., Cortese, I., Wandinger, K.P., McFarland, H.F., Martin, R., 2001. CD4<sup>+</sup>CD28<sup>-</sup> costimulation-independent T cells in multiple sclerosis. *J Clin Invest*. 108, 1185-94.
- Mars, L.T., Saikali, P., Liblau, R.S., Arbour, N., 2011. Contribution of CD8 T lymphocytes to the immuno-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. *Biochim Biophys Acta*. 1812, 151-61.
- Mason, D.W., Charlton, H.M., Jones, A.J., Lavy, C.B., Puklavec, M., Simmonds, S.J., 1986. The fate of allogeneic and xenogeneic neuronal tissue transplanted into the third ventricle of rodents. *Neuroscience*. 19, 685-94.
- Matsushita, T., Yanaba, K., Bouaziz, J.-D., Fujimoto, M., Tedder, T.F., 2008. Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression. *J Clin Invest*. 118, 3420-30.
- Matyszak, M.K., Perry, V.H., 1996. The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system. *Neuroscience*. 74, 599-608.
- Matyszak, M.K., Perry, V.H., 1998. *Bacillus Calmette-Guérin* sequestered in the brain parenchyma escapes immune recognition. *J Neuroimmunol*. 82, 73-80.
- McColl, S.R., Staykova, M.A., Wozniak, A., Fordham, S., Bruce, J., Willenborg, D.O., 1998. Treatment with anti-granulocyte antibodies inhibits the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 161, 6421-6.
- McMahon, E.J., Bailey, S.L., Castenada, C.V., Waldner, H., Miller, S.D., 2005. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med*. 11, 335-9.
- McMenamin, P.G., Wealhall, R.J., Deverall, M., Cooper, S.J., Griffin, B., 2003. Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-

- dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy. *Cell Tissue Res.* 313, 259-69.
- Meek, J.L., Neff, N.H., 1973. Is cerebrospinal fluid the major avenue for the removal of 5-hydroxyindoleacetic acid from the brain? *Neuropharmacology.* 12, 497-9.
- Mensah-Brown, E.P., Shahin, A., Al Shamisi, M., Lukic, M.L., 2011. Early influx of macrophages determines susceptibility to experimental allergic encephalomyelitis in Dark Agouti (DA) rats. *J Neuroimmunol.* 232, 68-74.
- Merrill, J.E., Kono, D.H., Clayton, J., Ando, D.G., Hinton, D.R., Hofman, F.M., 1992. Inflammatory leukocytes and cytokines in the peptide-induced disease of experimental allergic encephalomyelitis in SJL and B10.PL mice. *Proc Natl Acad Sci USA.* 89, 574-8.
- Miller, S.D., Olson, J.K., Croxford, J.L., 2001. Multiple pathways to induction of virus-induced autoimmune demyelination: lessons from Theiler's virus infection. *J Autoimmun.* 16, 219-27.
- Milner, R., Crocker, S.J., Hung, S., Wang, X., Frausto, R.F., del Zoppo, G.J., 2007. Fibronectin- and vitronectin-induced microglial activation and matrix metalloproteinase-9 expression is mediated by integrins  $\alpha 5 \beta 1$  and  $\alpha v \beta 5$ . *J Immunol.* 178, 8158-67.
- Morris-Downes, M.M., Smith, P.A., Rundle, J.L., Piddlesden, S.J., Baker, D., Pham-Dinh, D., Heijmans, N., Amor, S., 2002. Pathological and regulatory effects of anti-myelin antibodies in experimental allergic encephalomyelitis in mice. *J Neuroimmunol.* 125, 114-24.
- Müllbacher, A., Waring, P., Tha Hla, R., Tran, T., Chin, S., Stehle, T., Museteanu, C., Simon, M.M., 1999. Granzymes are the essential downstream effector molecules for the control of primary virus infections by cytolytic leukocytes. *Proc Natl Acad Sci USA.* 96, 13950-5.
- Mullier, A., Bouret, S.G., Prevot, V., Dehouck, B., 2010. Differential distribution of tight junction proteins suggests a role for tanycytes in blood-hypothalamus barrier regulation in the adult mouse brain. *J Comp Neurol.* 518, 943-62.
- Mutsaers, S.E., Bishop, J.E., McGrouther, G., Laurent, G.J., 1997. Mechanisms of tissue repair: from wound healing to fibrosis. *Int J Biochem Cell Biol.* 29, 5-17.
- Nadler, E.P., Patterson, D., Violette, S., Weinreb, P., Lewis, M., Magid, M.S., Greco, M.A., 2009. Integrin  $\alpha v \beta 6$  and mediators of extracellular matrix deposition are up-regulated in experimental biliary atresia. *J Surg Res.* 154, 21-9.
- Nag, S., 2003. Morphology and molecular properties of cellular components of normal cerebral vessels. In: *The Blood-Brain Barrier. Vol.*, S. Nag, ed. eds. Humana Press, Toronto.
- Nag, S., Venugopalan, R., Stewart, D.J., 2007. Increased caveolin-1 expression precedes decreased expression of occludin and claudin-5 during blood-brain barrier breakdown. *Acta Neuropathol.* 114, 459-69.
- Nitta, T., Hata, M., Gotoh, S., Seo, Y., Sasaki, H., Hashimoto, N., Furuse, M., Tsukita, S., 2003. Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice. *J Cell Biol.* 161, 653-60.
- Noseworthy, J.H., Lucchinetti, C., Rodriguez, M., Weinshenker, B.G., 2000. Multiple sclerosis. *N Engl J Med.* 343, 938-52.
- Nottet, H.S., 1999. Interactions between macrophages and brain microvascular endothelial cells: role in pathogenesis of HIV-1 infection and blood - brain barrier function. *J Neurovirol.* 5, 659-69.

- Nygårdas, P.T., Määttä, J.A., Hinkkanen, A.E., 2000. Chemokine expression by central nervous system resident cells and infiltrating neutrophils during experimental autoimmune encephalomyelitis in the BALB/c mouse. *Eur J Immunol.* 30, 1911-8.
- Olivares-Villagómez, D., Wang, Y., Lafaille, J.J., 1998. Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med.* 188, 1883-94.
- Pardridge, W.M., 1983. Brain metabolism: a perspective from the blood-brain barrier. *Physiol Rev.* 63, 1481-535.
- Pashenkov, M., Huang, Y.M., Kostulas, V., Haglund, M., Söderström, M., Link, H., 2001. Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid. *Brain.* 124, 480-92.
- Pashenkov, M., Teleshova, N., Link, H., 2003. Inflammation in the central nervous system: the role for dendritic cells. *Brain pathology (Zurich, Switzerland).* 13, 23-33.
- Petito, C.K., Adkins, B., 2005. Choroid plexus selectively accumulates T-lymphocytes in normal controls and after peripheral immune activation. *J Neuroimmunol.* 162, 19-27.
- Piccio, L., Rossi, B., Scarpini, E., Laudanna, C., Giagulli, C., Issekutz, A.C., Vestweber, D., Butcher, E.C., Constantin, G., 2002. Molecular mechanisms involved in lymphocyte recruitment in inflamed brain microvessels: critical roles for P-selectin glycoprotein ligand-1 and heterotrimeric G(i)-linked receptors. *J Immunol.* 168, 1940-9.
- Piontek, J., Winkler, L., Wolburg, H., Müller, S.L., Zuleger, N., Piehl, C., Wiesner, B., Krause, G., Blasig, I.E., 2008. Formation of tight junction: determinants of homophilic interaction between classic claudins. *FASEB J.* 22, 146-58.
- Praetorius, J., 2007. Water and solute secretion by the choroid plexus. *Pflugers Arch.* 454, 1-18.
- Proescholdt, M.G., Hutto, B., Brady, L.S., Herkenham, M., 2000. Studies of cerebrospinal fluid flow and penetration into brain following lateral ventricle and cisterna magna injections of the tracer [<sup>14</sup>C]inulin in rat. *Neuroscience.* 95, 577-92.
- Randolph, D.A., Fathman, C.G., 2006. Cd4+Cd25+ regulatory T cells and their therapeutic potential. *Annu Rev Med.* 57, 381-402.
- Ransohoff, R.M., Kivisäkk, P., Kidd, G., 2003. Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nat Rev Immunol.* 3, 569-81.
- Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., Sallusto, F., 2009. C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol.* 10, 514-23.
- Reddy, J., Illes, Z., Zhang, X., Encinas, J., Pyrdol, J., Nicholson, L., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Kuchroo, V.K., 2004. Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci USA.* 101, 15434-9.
- Redzic, Z., 2011. Molecular biology of the blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: similarities and differences. *Fluids Barriers CNS.* 8, 3.
- Regezi, J.A., Ramos, D.M., Pytela, R., Dekker, N.P., Jordan, R.C., 2002. Tenascin and beta 6 integrin are overexpressed in floor of mouth in situ carcinomas and invasive squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 38, 332-6.
- Reina, M.A., López, A., Benito-León, J., Pulido, P., María, F., 2004. [Intracranial and spinal subdural hematoma: a rare complication of epidural and subarachnoid anesthesia]. *Rev Esp Anesthesiol Reanim.* 51, 28-39.



- Reiss, Y., Engelhardt, B., 1999. T cell interaction with ICAM-1-deficient endothelium in vitro: transendothelial migration of different T cell populations is mediated by endothelial ICAM-1 and ICAM-2. *Int Immunol.* 11, 1527-39.
- Richard, J.-F., Roy, M., Audoy-Rémus, J., Tremblay, P., Vallières, L., 2011. Crawling Phagocytes Recruited in the Brain Vasculature after Pertussis Toxin Exposure through IL6, ICAM1 and ITGαM. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*.
- Robbins, C.S., Swirski, F.K., 2010. The multiple roles of monocyte subsets in steady state and inflammation. *Cell Mol Life Sci.* 67, 2685-93.
- Roberts, L.M., Black, D.S., Raman, C., Woodford, K., Zhou, M., Haggerty, J.E., Yan, A.T., Cwirla, S.E., Grindstaff, K.K., 2008. Subcellular localization of transporters along the rat blood-brain barrier and blood-cerebral-spinal fluid barrier by in vivo biotinylation. *Neuroscience.* 155, 423-38.
- Rocha-Ramírez, L.M., Estrada-García, I., López-Marín, L.M., Segura-Salinas, E., Méndez-Aragón, P., Van Soolingen, D., Torres-González, R., Chacón-Salinas, R., Estrada-Parra, S., Maldonado-Bernal, C., López-Macías, C., Isibasi, A., 2008. Mycobacterium tuberculosis lipids regulate cytokines, TLR-2/4 and MHC class II expression in human macrophages. *Tuberculosis (Edinb).* 88, 212-20.
- Rouse, B.T., 2007. Regulatory T cells in health and disease. *J Intern Med.* 262, 78-95.
- Rutishauser, R.L., Kaech, S.M., 2010. Generating diversity: transcriptional regulation of effector and memory CD8 T-cell differentiation. *Immunol Rev.* 235, 219-33.
- Ryan, M., McCarthy, L., Rappuoli, R., Mahon, B.P., Mills, K.H., 1998. Pertussis toxin potentiates Th1 and Th2 responses to co-injected antigen: adjuvant action is associated with enhanced regulatory cytokine production and expression of the co-stimulatory molecules B7-1, B7-2 and CD28. *Int Immunol.* 10, 651-62.
- Sakaguchi, S., Miyara, M., Costantino, C.M., Hafler, D.A., 2010. FOXP3<sup>+</sup> regulatory T cells in the human immune system. *Nat Rev Immunol.* 10, 490-500.
- Sakai, K., Zamvil, S.S., Mitchell, D.J., Lim, M., Rothbard, J.B., Steinman, L., 1988. Characterization of a major encephalitogenic T cell epitope in SJL/J mice with synthetic oligopeptides of myelin basic protein. *J Neuroimmunol.* 19, 21-32.
- Sakka, L., Chazal, J., 2005. [The meninges, an anatomical point of view]. *Morphologie.* 89, 35-42.
- Savarin, C., Stohlman, S.A., Atkinson, R., Ransohoff, R.M., Bergmann, C.C., 2010. Monocytes regulate T cell migration through the glia limitans during acute viral encephalitis. *J Virol.* 84, 4878-88.
- Schilling, M., Strecker, J.-K., Ringelstein, E.B., Kiefer, R., Schäbitz, W.-R., 2009. Turn-over of meningeal and perivascular macrophages in the brain of MCP-1-, CCR-2- or double knockout mice. *Exp Neurol.* 219, 583-5.
- Schmidlin, H., Diehl, S.A., Blom, B., 2009. New insights into the regulation of human B-cell differentiation. *Trends Immunol.* 30, 277-85.
- Schneider, C., Schuetz, G., Zollner, T.M., 2009. Acute neuroinflammation in Lewis rats - a model for acute multiple sclerosis relapses. *J Neuroimmunol.* 213, 84-90.
- Schulz, M., Engelhardt, B., 2005. The circumventricular organs participate in the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Cerebrospinal Fluid Res.* 2, 8.
- Secor, V.H., Secor, W.E., Gutekunst, C.A., Brown, M.A., 2000. Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis. *J Exp Med.* 191, 813-22.
- Semple, B.D., Kossmann, T., Morganti-Kossmann, M.C., 2010. Role of chemokines in CNS health and pathology: a focus on the CCL2/CCR2 and CXCL8/CXCR2 networks. *J Cereb Blood Flow Metab.* 30, 459-73.

- Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E., Aloisi, F., 2004. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol.* 14, 164-74.
- Serot, J.M., Foliguet, B., Béné, M.C., Faure, G.C., 1997. Ultrastructural and immunohistological evidence for dendritic-like cells within human choroid plexus epithelium. *Neuroreport.* 8, 1995-8.
- Shamri, R., Xenakis, J.J., Spencer, L.A., 2011. Eosinophils in innate immunity: an evolving story. *Cell Tissue Res.* 343, 57-83.
- Sherman, D.L., Brophy, P.J., 2005. Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci.* 6, 683-90.
- Smith, J.W., Vestal, D.J., Irwin, S.V., Burke, T.A., Cheresch, D.A., 1990. Purification and functional characterization of integrin alpha v beta 5. An adhesion receptor for vitronectin. *J Biol Chem.* 265, 11008-13.
- Sonobe, Y., Jin, S., Wang, J., Kawanokuchi, J., Takeuchi, H., Mizuno, T., Suzumura, A., 2007. Chronological changes of CD4(+) and CD8(+) T cell subsets in the experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis. *Tohoku J Exp Med.* 213, 329-39.
- Sørensen, T.L., Tani, M., Jensen, J., Pierce, V., Lucchinetti, C., Folcik, V.A., Qin, S., Rottman, J., Sellebjerg, F., Strieter, R.M., Frederiksen, J.L., Ransohoff, R.M., 1999. Expression of specific chemokines and chemokine receptors in the central nervous system of multiple sclerosis patients. *J Clin Invest.* 103, 807-15.
- Soulas, C., Donahue, R.E., Dunbar, C.E., Persons, D.A., Alvarez, X., Williams, K.C., 2009. Genetically modified CD34+ hematopoietic stem cells contribute to turnover of brain perivascular macrophages in long-term repopulated primates. *Am J Pathol.* 174, 1808-17.
- Spach, K.M., Blake, M., Bunn, J.Y., McElvany, B., Noubade, R., Blankenhorn, E.P., Teuscher, C., 2009. Cutting edge: the Y chromosome controls the age-dependent experimental allergic encephalomyelitis sexual dimorphism in SJL/J mice. *J Immunol.* 182, 1789-93.
- Stanley, N.C., Jackson, F.L., Orr, E.L., 1990. Attenuation of experimental autoimmune encephalomyelitis by Compound 48/80 in Lewis rats. *J Neuroimmunol.* 29, 223-8.
- Steffen, B.J., Butcher, E.C., Engelhardt, B., 1994. Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse. *Am J Pathol.* 145, 189-201.
- Steiner, O., Coisne, C., Cecchelli, R., Boscacci, R., Deutsch, U., Engelhardt, B., Lyck, R., 2010. Differential roles for endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in shear-resistant T cell arrest, polarization, and directed crawling on blood-brain barrier endothelium. *J Immunol.* 185, 4846-55.
- Storch, M.K., Stefferl, A., Brehm, U., Weissert, R., Wallström, E., Kerschensteiner, M., Olsson, T., Linington, C., Lassmann, H., 1998. Autoimmunity to myelin oligodendrocyte glycoprotein in rats mimics the spectrum of multiple sclerosis pathology. *Brain Pathol.* 8, 681-94.
- Strazielle, N., Gherzi-Egea, J.F., 1999. Demonstration of a coupled metabolism-efflux process at the choroid plexus as a mechanism of brain protection toward xenobiotics. *J Neurosci.* 19, 6275-89.
- Strazielle, N., Gherzi-Egea, J.F., 2000. Choroid plexus in the central nervous system: biology and physiopathology. *J Neuropathol Exp Neurol.* 59, 561-74.

- Strazielle, N., Belin, M.F., Gherzi-Egea, J.F., 2003. Choroid plexus controls brain availability of anti-HIV nucleoside analogs via pharmacologically inhibitable organic anion transporters. *AIDS*. 17, 1473-85.
- Strazielle, N., Khuth, S.T., Gherzi-Egea, J.F., 2004. Detoxification systems, passive and specific transport for drugs at the blood-CSF barrier in normal and pathological situations. *Adv Drug Deliv Rev*. 56, 1717-40.
- Strazielle, N., Gherzi-Egea, J.-F., 2005. Factors affecting delivery of antiviral drugs to the brain. *Rev Med Virol*. 15, 105-33.
- Strazielle, N., Mutin, M., Gherzi-Egea, J.F., 2005. [The choroid plexuses: a dynamic interface between the blood and the cerebrospinal fluid]. *Morphologie*. 89, 90-101.
- Stromnes, I.M., Cerretti, L.M., Liggitt, D., Harris, R.A., Goverman, J.M., 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med*. 14, 337-42.
- Sufianov, A.A., Sufianova, G.Z., Iakimov, I.A., 2009. Microsurgical study of the interpeduncular cistern and its communication with adjoining cisterns. *Childs Nerv Syst*. 25, 301-8.
- Sullivan, B.M., Locksley, R.M., 2009. Basophils: a nonredundant contributor to host immunity. *Immunity*. 30, 12-20.
- Swanborg, R.H., 1995. Experimental autoimmune encephalomyelitis in rodents as a model for human demyelinating disease. *Clin Immunol Immunopathol*. 77, 4-13.
- Swanborg, R.H., 2001. Experimental autoimmune encephalomyelitis in the rat: lessons in T-cell immunology and autoreactivity. *Immunol Rev*. 184, 129-35.
- Szmydynger-Chodobska, J., Strazielle, N., Zink, B.J., Gherzi-Egea, J.-F., Chodobski, A., 2009. The role of the choroid plexus in neutrophil invasion after traumatic brain injury. *J Cereb Blood Flow Metab*. 29, 1503-16.
- Szmydynger-Chodobska, J., Strazielle, N., Gandy, J.R., Keefe, T.H., Zink, B.J., Gherzi-Egea, J.-F., Chodobski, A., 2011. Posttraumatic invasion of monocytes across the blood-cerebrospinal fluid barrier. *J Cereb Blood Flow Metab*.
- Thakker, P., Leach, M.W., Kuang, W., Benoit, S.E., Leonard, J.P., Marusic, S., 2007. IL-23 is critical in the induction but not in the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol*. 178, 2589-98.
- Thibeault, I., Laflamme, N., Rivest, S., 2001. Regulation of the gene encoding the monocyte chemoattractant protein 1 (MCP-1) in the mouse and rat brain in response to circulating LPS and proinflammatory cytokines. *J Comp Neurol*. 434, 461-77.
- Torres, B.A., Kominsky, S., Perrin, G.Q., Hobeika, A.C., Johnson, H.M., 2001. Superantigens: the good, the bad, and the ugly. *Exp Biol Med (Maywood)*. 226, 164-76.
- Tran, E.H., Hoekstra, K., van Rooijen, N., Dijkstra, C.D., Owens, T., 1998. Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice. *J Immunol*. 161, 3767-75.
- Trapp, B.D., Ransohoff, R., Rudick, R., 1999. Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Curr Opin Neurol*. 12, 295-302.
- Tsunoda, I., Kuang, L.Q., Theil, D.J., Fujinami, R.S., 2000. Antibody association with a novel model for primary progressive multiple sclerosis: induction of relapsing-remitting and progressive forms of EAE in H2s mouse strains. *Brain Pathol*. 10, 402-18.
- Tubbs, R.S., Louis, R.G., Wartmann, C.T., Loukas, M., Shoja, M.M., Apaydin, N., Oakes, W.J., 2008. The velum interpositum revisited and redefined. *Surg Radiol Anat*. 30, 131-5.

- Tubbs, R.S., Krishnamurthy, S., Verma, K., Shoja, M.M., Loukas, M., Mortazavi, M.M., Cohen-Gadol, A.A., 2011. Cavum velum interpositum, cavum septum pellucidum, and cavum vergae: a review. *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*.
- Vajkoczy, P., Laschinger, M., Engelhardt, B., 2001. Alpha4-integrin-VCAM-1 binding mediates G protein-independent capture of encephalitogenic T cell blasts to CNS white matter microvessels. *J Clin Invest*. 108, 557-65.
- Vandenabeele, F., Creemers, J., Lambrechts, I., 1996. Ultrastructure of the human spinal arachnoid mater and dura mater. *J Anat*. 189 ( Pt 2), 417-30.
- Veening, J.G., Barendregt, H.P., 2010. The regulation of brain states by neuroactive substances distributed via the cerebrospinal fluid; a review. *Cerebrospinal Fluid Res*. 7, 1.
- Vercellino, M., Votta, B., Condello, C., Piacentino, C., Romagnolo, A., Merola, A., Capello, E., Mancardi, G.L., Mutani, R., Giordana, M.T., Cavalla, P., 2008. Involvement of the choroid plexus in multiple sclerosis autoimmune inflammation: a neuropathological study. *J Neuroimmunol*. 199, 133-41.
- Vergelli, M., Hemmer, B., Utz, U., Vogt, A., Kalbus, M., Tranquill, L., Conlon, P., Ling, N., Steinman, L., McFarland, H.F., Martin, R., 1996. Differential activation of human autoreactive T cell clones by altered peptide ligands derived from myelin basic protein peptide (87-99). *Eur J Immunol*. 26, 2624-34.
- von Wedel-Parlow, M., Schrot, S., Lemmen, J., Treeratanaipiboon, L., Wegener, J., Galla, H.-J., 2011. Neutrophils cross the BBB primarily on transcellular pathways: an in vitro study. *Brain Res*. 1367, 62-76.
- Waldner, H., Collins, M., Kuchroo, V.K., 2004. Activation of antigen-presenting cells by microbial products breaks self tolerance and induces autoimmune disease. *J Clin Invest*. 113, 990-7.
- Wang, Y., Luo, W., Reiser, G., 2007. Activation of protease-activated receptors in astrocytes evokes a novel neuroprotective pathway through release of chemokines of the growth-regulated oncogene/cytokine-induced neutrophil chemoattractant family. *Eur J Neurosci*. 26, 3159-68.
- Wedemeyer, J., Tsai, M., Galli, S.J., 2000. Roles of mast cells and basophils in innate and acquired immunity. *Curr Opin Immunol*. 12, 624-31.
- Weiss, N., Miller, F., Cazaubon, S., Couraud, P.O., 2009. [Biology of the blood-brain barrier: Part I]. *Rev Neurol (Paris)*. 165, 863-74.
- Wekerle, H., Kojima, K., Lannes-Vieira, J., Lassmann, H., Linington, C., 1994. Animal models. *Ann Neurol*. 36 Suppl, S47-53.
- Wekerle, H., 2008. Lessons from multiple sclerosis: models, concepts, observations. *Ann Rheum Dis*. 67 Suppl 3, iii56-60.
- Weller, R.O., Djuanda, E., Yow, H.-Y., Carare, R.O., 2009. Lymphatic drainage of the brain and the pathophysiology of neurological disease. *Acta Neuropathol*. 117, 1-14.
- Welsh, C.J., Steelman, A.J., Mi, W., Young, C.R., Storts, R., Welsh, T.H., Meagher, M.W., 2009. Neuroimmune interactions in a model of multiple sclerosis. *Ann N Y Acad Sci*. 1153, 209-19.
- Wewer, C., Seibt, A., Wolburg, H., Greune, L., Schmidt, M.A., Berger, J., Galla, H.-J., Quitsch, U., Schwerk, C., Schrotten, H., Tenenbaum, T., 2011. Transcellular migration of neutrophil granulocytes through the blood-cerebrospinal fluid barrier after infection with *Streptococcus suis*. *J Neuroinflammation*. 8, 51.
- Wilcoxon, S.C., Kirkman, E., Dowdell, K.C., Stohlman, S.A., 2000. Gender-dependent IL-12 secretion by APC is regulated by IL-10. *J Immunol*. 164, 6237-43.

- Williams, K., Alvarez, X., Lackner, A.A., 2001. Central nervous system perivascular cells are immunoregulatory cells that connect the CNS with the peripheral immune system. *Glia*. 36, 156-64.
- Winkler-Pickett, R., Young, H.A., Cherry, J.M., Diehl, J., Wine, J., Back, T., Bere, W.E., Mason, A.T., Ortaldo, J.R., 2008. In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses. *J Immunol*. 180, 4495-506.
- Witt, K.A., Mark, K.S., Hom, S., Davis, T.P., 2003. Effects of hypoxia-reoxygenation on rat blood-brain barrier permeability and tight junctional protein expression. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 285, H2820-31.
- Wojcik, E., Carrithers, L.M., Carrithers, M.D., 2011. Characterization of epithelial V-like antigen in human choroid plexus epithelial cells: potential role in CNS immune surveillance. *Neurosci Lett*. 495, 115-20.
- Wolburg, H., Wolburg-Buchholz, K., Engelhardt, B., 2005. Diapedesis of mononuclear cells across cerebral venules during experimental autoimmune encephalomyelitis leaves tight junctions intact. *Acta Neuropathol*. 109, 181-90.
- Wuerfel, J., Haertle, M., Waiczies, H., Tysiak, E., Bechmann, I., Wernecke, K.D., Zipp, F., Paul, F., 2008. Perivascular spaces--MRI marker of inflammatory activity in the brain? *Brain*. 131, 2332-40.
- Yang, M., Chien, C., Lu, K., 1999. Morphological, immunohistochemical and quantitative studies of murine brain mast cells after mating. *Brain Res*. 846, 30-9.
- Zamai, L., Ahmad, M., Bennett, I.M., Azzoni, L., Alnemri, E.S., Perussia, B., 1998. Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells. *J Exp Med*. 188, 2375-80.
- Zamvil, S.S., Mitchell, D.J., Moore, A.C., Schwarz, A.J., Stiefel, W., Nelson, P.A., Rothbard, J.B., Steinman, L., 1987. T cell specificity for class II (I-A) and the encephalitogenic N-terminal epitope of the autoantigen myelin basic protein. *J Immunol*. 139, 1075-9.
- Zekki, H., Feinstein, D.L., Rivest, S., 2002. The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with a profound and sustained transcriptional activation of the genes encoding toll-like receptor 2 and CD14 in the mouse CNS. *Brain Pathol*. 12, 308-19.
- Zhu, Y., Saito, K., Murakami, Y., Asano, M., Iwakura, Y., Seishima, M., 2006. Early increase in mRNA levels of pro-inflammatory cytokines and their interactions in the mouse hippocampus after transient global ischemia. *Neurosci Lett*. 393, 122-6.



## RESUME

Le système nerveux central est un site particulier vis-à-vis du système immunitaire, en raison de la présence de la barrière hémato-encéphalique et de la barrière sang-liquide céphalorachidien. Les plexus choroïdes ont été considérés comme une voie d'entrée de certains lymphocytes dans le système nerveux central. Et le liquide céphalo-rachidien a été considéré comme une voie préférentielle de circulation des cellules immunes au cours de la surveillance neuro-immunitaire de l'ensemble des compartiments cérébraux, puisque le LCR circule des ventricules, aux espaces sous-arachnoïdiens ainsi qu'aux velum et citernes internes. L'implication du système plexus choroïdes-liquide céphalorachidien dans l'infiltration cellulaire et la distribution des différents effecteurs immuns a été évaluée. Premièrement, nous avons analysé la relation entre le LCR et la répartition des différentes cellules immunes au sein du système nerveux central, dans deux modèles d'encéphalite auto-immune expérimentale, utilisé comme modèle de la sclérose en plaque. Deuxièmement, nous avons recherché les partenaires moléculaires pouvant être impliqués dans la mise en place d'une inflammation, tels que les molécules d'adhésion exprimées par l'épithélium choroïdien, et les chimiokines pouvant être sécrétées dans le liquide céphalorachidien. Nos résultats identifient les plexus choroïdes comme une source de chimiokines sécrétées dans le liquide céphalorachidien, ce dernier orchestrant la distribution des différents effecteurs immunitaires au cours de l'inflammation.

---

### **The choroid plexus-cerebrospinal fluid system are involved in the early infiltration of immune cells in central nervous system inflammation**

---

## ABSTRACT

The central nervous system is an immunologically specialized site, because of the blood-brain barrier and the blood-cerebrospinal fluid barrier. The choroid plexuses had been considered as a preferential site for the entry of lymphocytes into the CNS. And the cerebrospinal fluid has been considered as a preferential pathway of circulation for immune cells during physiological neuroimmune surveillance, in all cerebral compartments, as the cerebrospinal fluid circulates from the ventricles to the subarachnoid spaces as well as the velum and internal cisterns. We evaluate the involvement of the choroid plexus-cerebrospinal fluid system in the cerebral infiltration and distribution of immune cells in CNS inflammation. First we realized a time course analysis of the different type of immune cell association with the CSF-containing compartments in two experimental autoimmune encephalomyelitis, models of multiple sclerosis. Secondly, we analyzed the molecular partners that could be involved in CNS inflammation development, such as adhesion molecules expressed on the choroid plexus, and chemokines secreted into the cerebrospinal fluid. Results identified the choroid plexuses as a source of chemokines, released into the cerebrospinal fluid that orchestrates the immune cell invasion during CNS inflammation.

---

DISCIPLINE : Neurosciences

---

## MOTS-CLES

Encéphalomyélite Auto-immune Expérimentale, Plexus choroïdes, Liquide céphalorachidien, Chimiokines, Inflammation

---

## INTITULE ET ADRESSE DU LABORATOIRE

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, CRNL U1028-UMR5292  
Faculté de médecine RTH Laënnec, 7 rue Guillaume Paradin, 69372 LYON