



HAL
open science

Identification de programmes d'activation macrophagique et microgliale dans les formes progressives de la sclérose en plaques

Alice Lhuillier

► **To cite this version:**

Alice Lhuillier. Identification de programmes d'activation macrophagique et microgliale dans les formes progressives de la sclérose en plaques. Neurosciences [q-bio.NC]. Université Claude Bernard - Lyon I, 2014. Français. NNT : 2014LYO10096 . tel-01056829

HAL Id: tel-01056829

<https://theses.hal.science/tel-01056829>

Submitted on 20 Aug 2014

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

(arrêté du 7 août 2006)

soutenue publiquement le 20 Juin 2014

par

Alice LHUILLIER

**Identification de programmes d'activation macrophagique et
microgliale dans les formes progressives de la sclérose en plaques**

Directeur de thèse :

Professeur Serge NATAF

JURY:

Professeur Gilles EDAN

Professeur Christine STADELMANN-NESSLER

Docteur David LAPLAUD

Docteur Séverine BOILLEE

Professeur Serge NATAF

Président du Jury

Rapporteur

Rapporteur

Examineur

Directeur de thèse

UNIVERSITE CLAUDE BERNARD - LYON 1

Président de l'Université

M. François-Noël GILLY

Vice-président du Conseil d'Administration

M. le Professeur Hamda BEN HADID

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

M. le Professeur Philippe LALLE

Vice-président du Conseil Scientifique

M. le Professeur Germain GILLET

Directeur Général des Services

M. Alain HELLEU

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 : Mme la Professeure C. BURILLON

Faculté d'Odontologie

Directeur : M. le Professeur D. BOURGEOIS

Institut des Sciences Pharmaceutiques et Biologiques

Directeur : Mme la Professeure C. VINCIGUERRA

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 : Mme. la Professeure A-M. SCHOTT

COMPOSANTES ET DEPARTEMENTS DE SCIENCES ET TECHNOLOGIE

Faculté des Sciences et Technologies

Directeur : M. F. DE MARCHI

Département Biologie

Directeur : M. le Professeur F. FLEURY

Département Chimie Biochimie

Directeur : Mme Caroline FELIX

Département GEP

Directeur : M. Hassan HAMMOURI

Département Informatique

Directeur : M. le Professeur S. AKKOUCHE

Département Mathématiques

Directeur : M. Georges TOMANOV

Département Mécanique

Directeur : M. le Professeur H. BEN HADID

Département Physique

Directeur : M. Jean-Claude PLENET

UFR Sciences et Techniques des Activités Physiques et Sportives

Directeur : M. Y. VANPOULLE

Observatoire des Sciences de l'Univers de Lyon

Directeur : M. B. GUIDERDONI

Polytech Lyon

Directeur : M. P. FOURNIER

Ecole Supérieure de Chimie Physique Electronique

Directeur : M. G. PIGNAULT

Institut Universitaire de Technologie de Lyon 1

Directeur : M. C. VITON

Ecole Supérieure du Professorat et de l'Education

Directeur : M. A. MOUGNIOTTE

Institut de Science Financière et d'Assurances

Directeur : M. N. LEBOISNE

RESUME en français

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie neuro-inflammatoire chronique, première cause de handicap chez le jeune adulte. Actuellement, aucun traitement ne freine l'aggravation des symptômes liée aux formes progressives. Bien que connue, l'implication des macrophages et de la microglie dans la démyélinisation et l'atteinte axonale doit être plus finement caractérisée. Ce d'autant plus que la plasticité fonctionnelle de ces cellules suggère une réponse spécifique selon la pathologie, la localisation des lésions et le stade évolutif de la maladie. Ce travail de thèse a consisté en une caractérisation moléculaire des programmes d'activation macrophagique/ microgliale dans deux types d'altérations tissulaires du système nerveux central des patients SEP : les zones partiellement démyélinisées bordant les plaques de la moelle épinière et les lésions corticales. Cette étude a été réalisée sur des tissus *post-mortem* de patients atteints de formes progressives, formes dans lesquelles les lésions médullaires et corticales sont nombreuses et impliquées dans le handicap progressif et irréversible. Nous avons identifié des spécificités moléculaires caractérisant l'activation macrophagique/microgliale au cours de la SEP en comparant, par une approche *in silico*, les profils caractérisés à ceux observés dans des pathologies neuro-dégénératives à composantes inflammatoires, la maladie d'Alzheimer et de Parkinson notamment. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'activation chronique des macrophages/cellules microgliales contribue à l'extension à bas bruit des lésions médullaires et corticales pendant la phase progressive de la SEP et proposent de nouvelles cibles thérapeutiques.

TITRE en anglais

Identification of macrophagic and microglial activation programs in progressive forms of multiple sclerosis

RESUME en anglais

Multiple sclerosis (MS) is a chronic neuro-inflammatory disease and the most common cause of chronic neurological disability in young adults. No treatment is currently available to prevent the aggravation of symptoms in the progressive forms of the disease. The involvement of macrophages and microglia in demyelination and axonal injury is well known but need to be further characterized. Especially, the high level of functional plasticity harboured by macrophages/ microglia suggests that these cells engage specific activation programs depending on the disease, its evolution stage and the localization of lesions. In this context, this PhD thesis was essentially aimed to characterize macrophage/microglia activation programs in two categories of tissue alterations observed in the *post-mortem* central nervous system from MS patients: 1) partially demyelinated areas at the border of spinal cord plaques and 2) cortical lesions. These two particular types of lesions are both highly frequent in progressive forms of MS and suspected to be involved in chronic and irreversible neurological disability. Using an *in silico* approach, the macrophage/microglia activation programs identified in MS were then compared to those observed in neurodegenerative and inflammatory disorders such as Alzheimer's disease and Parkinson's disease. Overall, our results suggest that the chronic activation of macrophages and microglia largely contributes to the slow and chronic expansion of MS lesions in progressive forms of the disease. Our work also proposes new therapeutic targets.

DISCIPLINE

Neurosciences

MOTS-CLES

Sclérose en plaques, Neuro-inflammation, Macrophages, Cellules microgliales, Astrocytes, Démyélinisation, Neuro-dégénérescence

INTITULE et ADRESSE du LABORATOIRE

Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, CRNL INSERM U1028 – CNRS UMR5292
Faculté de médecine Laënnec, 7 Rue Guillaume Paradin, 69 372 LYON Cedex 08, France

A Nicolas et ma famille,

Aux chercheurs de vérité,

« Tout ce que j'accomplis avec attention se révélera à moi dans son véritable sens. Et je percevrai alors différemment et plus pleinement les êtres et les choses qui m'entourent. Je les verrai avec attention et, finalement, j'ouvrirai les yeux sur ce qui est vraiment important en toute chose. »

Anselm Grün

Remerciements

Inspirés d'une histoire vraie

Ce travail de thèse a été réalisé au sein du Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon (CRNL), dans l'équipe ONCOFLAM « neuro-oncologie et neuro-inflammation », dirigée par le Professeur Jérôme Honnorat. Je le remercie de m'avoir accueillie au sein de son laboratoire.

J'adresse toute ma gratitude à l'ensemble des membres du jury qui me font l'honneur de juger mon travail de thèse. Je remercie le Professeur Christine Stadelmann et le Docteur David Laplaud d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, et le Professeur Gilles Edan et le Docteur Séverine Boillée d'avoir accepté de faire partie du jury en tant qu'examinateurs. Un merci particulier à Séverine Boillée qui, avec Sakina et Pinar, m'a transmis la majorité des techniques que je sais utiliser aujourd'hui, de la culture des cellules microgliales aux coupes flottantes... Merci au Professeur Christine Stadelmann, au Professeur Gilles Edan et au Docteur David Laplaud d'avoir soutenu mon travail lorsque je vous rencontrais pour la première fois aux congrès de l'association pour la recherche sur la sclérose en plaques (ARSEP).

L'évocation de deux très bons souvenirs de cette thèse me permettra de remercier deux personnes, qui ont contribué à leur manière à ma thèse, et ceux que j'ai pu rencontrer à ces occasions.

Tout d'abord, je garderai un très bon souvenir de mon séjour passé à Londres au cours de ma première année. Je remercie le Professeur Richard Reynolds de m'avoir accueillie chaleureusement dans son laboratoire et sa banque de tissus, et d'avoir suivi mon travail au plus près au cours de ces années. Merci pour le travail de correction qu'il a mené au grès des remaniements et des soumissions de mon article principal. Merci surtout pour m'avoir fait découvrir et apprécier l'accent londonien, l'anglais comme on ne l'apprend pas à l'école et pas vraiment non plus en Ecosse... Merci aussi aux autres membres du laboratoire pour avoir partagé avec moi quelques petits plaisirs « british », prendre le thé accompagné d'un « scone », regarder un « musical »... Ce laboratoire donnait l'image d'un laboratoire idéal, neuf, où les microscopes sont offerts par des donateurs attentionnés, où les patients viennent régulièrement s'informer, où les étudiants font des concours de gâteaux, de « journal club » ou se racontent leur demande en mariage. Ce séjour fut l'occasion de demander une bourse de voyage à l'ARSEP. Je remercie l'association, le Professeur Christine Stadelmann et le Professeur Gilles Edan d'avoir soutenu et donné suite à mon projet. L'ARSEP a d'ailleurs financé une grande partie de mon travail de recherche. Je l'en remercie. Je remercie également le Docteur Géraldine Androdias qui avait initié le regroupement et l'analyse des échantillons de moelle épinière de patients atteints de sclérose en plaques (SEP).

D'autre part, je n'oublierai pas les moments passés à l'occasion du congrès européen de la SEP (ECTRIMS) à Lyon en 2012. En particulier, restera gravé dans ma mémoire le banquet des Halles Bocuse. Je remercie feu le Professeur Christian Confavreux de m'avoir aidé à préparer ma présentation orale. Merci aussi du réel intérêt qu'il a toujours porté à mon travail, et de la richesse de ses commentaires, depuis la première lecture du manuscrit à l'issue de mon master jusqu'à la veille de sa mort. C'était un honneur pour moi d'avoir pu bénéficier de son soutien et de profiter de ses conseils. Sa perte affecta grandement le laboratoire et les chercheurs français de la SEP. Nous assistions au départ d'un grand visionnaire dans le domaine.

Enfin, peut-être le troisième meilleur souvenir de cette thèse fut la rencontre entre ces deux personnages, le Professeur Richard Reynolds et le Professeur Christian Confavreux, au début de ma première année. Un échange riche de sciences comme il est difficile d'en avoir. Cette journée s'acheva par un dîner au restaurant lyonnais Têtedoie que je n'oublierai pas.

Le Professeur Serge Nataf a dirigé ce travail. Je l'en remercie. Je lui suis reconnaissante de m'avoir confié un projet qui me tenait à cœur depuis mon arrivée en master. L'activation

microgliale a jalonné mon parcours de recherche depuis le début, depuis l'inflammation de la rétine écossaise en 2010 à la SEP Lyonnaise aujourd'hui, en passant par la sclérose amyotrophique latérale parisienne. Je le remercie de m'avoir fait rencontrer de nombreuses personnes, notamment celles précédemment citées, et de m'avoir permis d'échanger avec eux. Merci aussi de m'avoir permis de travailler sur des échantillons humains, plutôt que sur un modèle animal, afin d'approcher de plus près les mécanismes physiopathologiques. Je n'oublierai pas les cellules microgliales, ces travailleurs de l'ombre, longtemps considérées comme de simples sentinelles, alors qu'elles travaillent perpétuellement avec minutie afin de préserver l'intégrité du SNC. Je les avais observées pour la première fois sur les vidéos de Davalos, émerveillée par leur rapidité d'action et leur dextérité. Depuis, je ne me suis pas lassée de les observer durant ces trois années de thèse. Merci Olivier de me faire croire que je les verrai un jour bouger en temps réel.

J'ai découvert avec curiosité la complexité qui se cache derrière la SEP à l'occasion d'une approche bibliographique en première année de master. Encadrée par l'épouse de mon directeur de thèse, j'ai été dirigée vers ce laboratoire où j'ai passé une bonne partie de mon master. Merci Nathalie de m'avoir transmis votre passion de l'immunologie. J'ai continué d'approcher la SEP par le récit des membres du corps médical de ma famille, décrivant des patients persévérants et attachants. Puis, le diagnostic tombe chez des jeunes de mon âge. La thèse se poursuit, et je rencontre des patients à Lyon, puis à Londres, qui mettent tant d'espoir dans la recherche d'aujourd'hui. Comment les décevoir ?

Un grand merci au Docteur Pascale Giraudon pour son aide précieuse. Merci d'avoir accepté de jouer le rôle officiel d'entraîneur. Tu es bien assez occupée mais beaucoup apprécies de s'en remettre à tes conseils. Merci pour tes encouragements et ton naturel optimiste qui m'ont donné la force de donner le meilleur de moi-même. Tout résultat à tes yeux devient passionnant. Merci pour tes précieux conseils qui ont aidé à l'élaboration de ce rapport. Passionnée de biologie, d'art et d'humanité, tu possèdes ce grain de folie, que tu n'aimes pas que je qualifie de la sorte mais que je crois nécessaire à l'avancée de la recherche. Tu savais que je bouillonnais intérieurement d'idées et de questions. J'aurais beaucoup aimé travailler avec vous et participer au bouillonnement qui anime vos discussions de recherche. Je le faisais silencieusement, presque. Merci pour les critiques de cinéma, je savais toujours quel film nous irions voir. Merci pour être le pilier du bureau.

Je remercie l'ensemble des membres passés et actuels du laboratoire pour m'avoir fait participer à la vie du laboratoire. Merci pour leur soutien et leur gentillesse.

Merci Marie et Chantal, les reines de l'histologie. Merci Marie pour ton accueil dans le laboratoire et ton soutien, comme une petite veilleuse. Quelle dommage quand, très vite, tu as dû t'éloigner au 5^{ème} étage. Merci Chantal pour ton sens du service.

Merci pour ces années de partage du bureau, qui m'ont sans doute fait revenir. Merci Adeline et Charlotte pour tous les matins souriants qui aident à commencer la journée dans la bonne humeur et la couleur ! Vous êtes partis trop vite, nos partages de repas avec. Merci à Sylvie, la reine du Western. Merci pour tes délicates attentions, pour tes caramels au beurre salé et ton tarama maison. Merci Josselin pour tes coupes flottantes et leurs vertus apaisantes. Merci pour avoir partagé le même encadrant. Je garderai un bon souvenir de ta mascotte et de notre séjour à Berlin. Merci Romain, pierre d'angle du réseau SEPien, Céline, arrivée de bon matin, Elodie pour ton air plein d'entrain. Merci Claire pour nos nombreux échanges et ton soutien au quotidien. Il est toujours plus sage d'être de ton côté. Je ne t'oublierai pas et je me rappellerai de toi en pensant à nos attaches respectives dans le centre berrichon ou le 93 et peut être au nanodrop. Enfin, merci Anne pour avoir été à la hauteur en remplaçant Adeline, sans parler bien sûr de ton côté « reine du cytomètre » (je sais que tu aimeras bien !), même si je n'ai pas eu la chance de manipuler cette merveilleuse machine. On voudrait que tu mettes au point tous les tests de la terre car ton amour du travail bien fait est plus fort que n'importe quelle envie. J'espère que tu obtiendras un jour le CDI dont tu rêves tant et qu'il te permettra de réaliser tes autres rêves, de voyages et de peinture... mais surtout que nous resterons amies.

Merci à mon deuxième bureau, mon bureau d'adoption. Monique, chef de file, passionnée des astrocytes et de peinture, mais aussi de voyages et de cuisine, merci pour ton attention, ton écoute et ta patience. Je n'oublierai pas notre escapade berlinoise et probablement jamais cette année de découverte de la peinture, je regretterai seulement de ne pas avoir commencé plus tôt. Merci Nathalie, pour tes passages furtifs et ta compréhension, Karen et Manon, pour vos trop courts passages, Léa pour ton arrivée pétillante. Je te souhaite une thèse riche d'aventures. Merci Marie-Eve pour tes bons repas de maman et tes bons produits, pour ta simplicité et ta joie et de vivre. Enfin, merci Stéphanie pour avoir partagé ton amitié. Nous avons vu grandir Léonie, j'espère que les difficultés de la vie t'aideront à rebondir pour lui offrir une vie encore plus belle.

Que de bureaux, que de rencontres dans ce laboratoire ! Merci Céline pour m'avoir confié les clefs d'un jardin secret. Nous aimerions passer du temps, comme toi, à gratter la terre où peut germer une petite graine. Jean-François et Nathalie, pour votre présence discrète mais efficace, Naura, Claire, Nicole, Roger, Jacques, Sandrine, Alicia, Nelly, Carole, Pascale... Marine, bonne route. Merci Laurent pour éclaircir les méandres de la transcriptomique. Merci Olivier, pour avoir apporté du sang neuf au laboratoire et pour nos repas au Resto U, Virginie, pour nos discussions. Merci Anne pour ton travail bien fait et ta voix chuchotée, comme si quelqu'un aurait pu nous entendre. Merci Josiane, parfois difficile à convaincre, mais toujours prête à nous aider dans nos démarches.

Merci à tous les étudiants, l'armée de master comme je les appelais, qui renouvellent constamment le laboratoire. J'ai vu se construire le CRNL. Je lui souhaite une longue vie et de réussir dans sa mission de fédérer les neurosciences sur Lyon, de collaborer avec, ou de concurrencer, Paris au mieux. Avec les étudiants du CRNL, nous avons construits les saisons du CRNL afin d'ouvrir les chercheurs à un regard plus humain sur les neurosciences, créer un site internet, la journée d'intégration des doctorants... que les initiatives continuent. Pierre et Aubin, Laurel et Hardy du laboratoire, merci pour avoir été les leaders étudiants du laboratoire, les dépanneurs informatiques. Merci Aubin pour s'être intéressé au travail d'autrui et Pierre pour avoir partagé ta musique et tes qualités de scénariste. Merci aux anciens doctorants pour qui nous avons appris à danser, chanter ou filmer, Charlotte, Angélique, Sébastien et Romain, aux master de passage, Aurélien, Eléonore... Merci Jessica pour regarder mes cellules microgliales préférées, Nicolas, Aurélien, Pauline, Aude, Laurent... ceux que j'oublie ou que je ne connais guère. Amandine, merci pour ton passage agréable. Chloé, merci pour ton enthousiasme et ta motivation. L'avenir du labo repose un peu sur toi !

Merci à toutes les personnes que j'ai rencontrées à l'occasion de mon travail de thèse. En particulier les acteurs des plateformes avec qui j'ai travaillé. Anne Wierynkx, Catherine Rey et Séverine Croze dans le domaine de la transcripomique ; Nicolas Gadot, Denis Ressenkoff et Batoule Smatti pour la microscopie ; Juan Carlos Prieto et Vincent Calvez pour la modélisation. Merci à Patrick Lecine et Laurent Bezin pour avoir participé à mon comité de thèse. Merci à Rémi Gervais pour son aide. J'ai apprécié de travailler avec des personnes extérieures au laboratoire, en dehors des chamailleries et des histoires de pouvoir qui ternissent le travail de recherche.

Je remercie aussi toute l'équipe pédagogique d'immunologie avec qui j'ai pris plaisir à découvrir l'enseignement et transmettre l'immunologie. En particulier, Christine Delprat, Mathias Faure, Morgan et Pierre... et à tous les élèves qui m'ont fait progresser. Merci d'avoir été mes cobayes. Merci Véronique pour m'avoir fait confiance en me laissant donner un cours sur la SEP. Ta passion pour l'enseignement est communicative. Merci à l'équipe du TP de physiologie pour ce bon moment. Merci Valérie pour ta thèse passionnante sur les astrocytes. Merci à l'équipe pédagogique de PC2i. Ce que j'ai appris pendant ces TD d'informatique me servira partout. Merci à Luc Ria pour son regard plein d'espoir sur la formation des enseignants.

J'en arrive aux personnes qui ont suivi l'avancée de ma thèse par un regard plus personnel. Merci à Emily, Laetitia, Mélanie et Guillaume, mes compagnons de thèse et des difficultés associées. Je vous souhaite bonne chance pour mener à bien vos projets, de la drosophile à la souris obèse, en passant par le zebrafish ou la prothèse dentaire... Clémence et Guillaume du côté du Chip

et reChip ou de la physique... Merci Marine et Roxane pour avoir fait naître l'envie d'enseigner. Merci au club des ingénieurs agronomes qui, parfois se lancent, on ne sait pour quelle raison, pour faire une thèse... Merci Olivier. Merci à quelques vétérinaires, Nicolas et Nasta. Merci à Isaline, Carole, Pétronille, Laura, Marie-Hélène, Sylvie et Quitterie pour être mes meilleures amies. Merci à Monsieur Demont et Monsieur Huet qui m'ont transmis leur passion de la Biologie et qui ont partagé avec nous leur amitié, et aux autres professeurs que je n'oublierai jamais. Vous me l'aviez bien dit de passer l'agrégation !

Et je n'oublie pas ceux sans qui je ne serais pas là. Merci à ma famille qui m'a vu partir à Lyon pour regarder de plus près une cellule microgliale et monter une autre famille. Merci Daniel pour m'avoir fait connaître Saint Louis où j'ai passé deux années inoubliables. Merci Emmanuel pour me permettre de croire encore au Prix Nobel dans la famille. Tu peux le prendre pour toi ou pour bébé Perrine qui deviendra sûrement passionnée de puits quantiques. J'aurai comme ça un doctorat pour terminer la brochette. Merci Juliette et Sandrine. Merci Papa pour ta relecture attentive et ta curiosité naturelle. Merci Maman pour m'avoir poussée jusqu'au bout. J'aurais essayé mais mes frères pourront avoir le dernier mot : « comme d'habitude, tu préfères faire comme Maman ». Merci à ma belle-famille pour m'avoir fait découvrir le Limousin, l'Ardèche, la Savoie et le Languedoc, des havres de paix. Merci à mes beaux-parents qui œuvrent pour l'amélioration de la vie des patients SEP. Merci Isabelle, Simon et Cécile pour les bons moments que nous avons passés pendant ces années.

Enfin, il me reste toute la vie pour te remercier, Nicolas, puisque tu as dit oui au début de cette thèse. Depuis que nous nous connaissons, les oiseaux volent au dessus de nos têtes, les fleurs de moutarde dansent au gré du vent, les lézards, les renards et les chouettes se côtoient. Comme j'ai aimé passer l'agrégation par procuration avec toi, j'espère que tu auras partagé cette thèse avec moi. Personne n'en a plus entendu parler que toi, personne ne l'a autant relue que toi, personne ne sera aussi content que toi que ce soit fini ! Un grand merci. Il ne nous en reste plus qu'une !

A tous les lecteurs, veuillez pardonner mes longueurs. J'ai pourtant tenté de faire une version courte tant vous avez nourri ma prose au delà de mon imagination. J'ai souvent pensé écrire un livre sur les événements qui se succèdent de jour en jour au laboratoire.

MERCI

ABBREVIATIONS

ACP : Analyse à composante principale	NOX : NADPH Oxidase
APRIL : A proliferation-inducing ligand	OPC : Oligodendrocyte precursor cell
AQP4 : Aquaporine 4	ORO : Oil-red O
ARSEP : Association pour la recherche sur la sclérose en plaques	OSMR : Oncostatin M receptor
BAFF : B cell activating factor	PLP : Proteolipid protein
BHE : Barrière hémato-encéphalique	RGS1 : Regulator of G protein signaling
BNE : BrainNet Europe	SAM : Significant analysis of microarray
CD : Cluster of differentiation (<i>e.g.</i> CD80)	SB : Substance blanche
CMH : Complexe majeur d'histocompatibilité	SBAN : Substance blanche d'apparence normale
CRLF : Cytokine receptor-like factor	SBAD : Substance blanche d'apparence douteuse
CPA : Cellule présentatrice d'antigène	SCF : Stem cell factor
Cx : Connexine	SEP : Sclérose en plaques
DIR : Double inversion récupération	SEF : Similar expression to FGF
DSS : Disability status scale	SGAN : Substance grise d'apparence normale
DTI : Diffusor tensor imaging	SG : Substance grise
EAAT : Excitatory amino acid transporter	SI : Système immunitaire
EAE : Encéphalite autoimmune expérimentale	SLA : Sclérose latérale amyotrophique
GFAP : Glial fibrillary acidic protein	SNC : Système nerveux central
HLA : Human leucocyte antigen	SNP : Système nerveux périphérique
IBA-1 : ionized calcium-binding adapter molecule 1	SPP1 : Secreted phosphoprotein 1
Ig : Immunoglobulines	TCR : T cell receptor
IMSGC : International multiple sclerosis group consortium	TGF-β : Tumor growth factor β
INF : Interferon	TLR : Toll-like receptor
IRF-1 : Interferon regulatory factor 1	TrKB : Tyrosine kinase receptor
IRM : Imagerie à résonance magnétique	TTA : Transfert d'aimantation
ITGAM : Integrin alpha M	
FOLR : Folate receptor	
LB : Lymphocytes B	
LCR : Liquide céphalo-rachidien	
LDP : Lésions de démyélinisation des périplaques	
LFB : Luxol fast blue	
LPS : Lipopolysaccharide	
LT : Lymphocytes T	
MBP : Myelin basic protein	
MOG : Myelin oligodendrocyte glycoprotein	
NAA : N-acétyl aspartate	
NADPH : Nicotinamide adenine dinucléotide phosphate	
NF : Neurofilament	
NK : Natural killer	
NKG2 : Natural killer group protein 2	
NMO : Neuromyélie optique	
NORB : Névrite optique rétro-bulbaire	

ABBREVIATIONS	14
AVANT-PROPOS.....	19
RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES	21

I. ETAT DES LIEUX D'UNE PATHOLOGIE NEURO-INFLAMMATOIRE ET NEURODEGENERATIVE : LA SCLEROSE EN PLAQUES (SEP)	23
---	-----------

<i>A/ La SEP en questions : une pathologie bien connue bien mal comprise</i>	<i>23</i>
--	-----------

<i>B/ Clinique et neuropathologie de la SEP</i>	<i>26</i>
---	-----------

1) L'histoire naturelle de la SEP.....	26
a. L'histoire de sa découverte.....	26
b. Résumé épidémiologique : une maladie fréquente du jeune adulte.....	28
c. Les formes d'évolution de la SEP : une ou plusieurs maladies ?.....	29
2) Comment diagnostiquer la SEP ?	31
a. Sémiologie de la SEP : des atteintes diverses.....	31
b. Des examens complémentaires nécessaires	31
De l'apport des données IRM ou comment résoudre le paradoxe clinico-radiologique	32
L'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR).....	34
L'analyse des potentiels évoqués	35
c. Les critères diagnostiques	36
3) Ce que nous apprennent les analyses de tissus SEP <i>post-mortem</i>	37
a. Les lésions de la substance blanche : les lésions classiques de la SEP	38
Les plaques de démyélinisation.....	38
Les lésions remyélinisées	38
La classification des lésions SEP	41
b. L'entrée en jeu des lésions corticales.....	41
Les lésions de la substance grise	41
L'inflammation méningée.....	43
4) Pourquoi étudier les lésions de la moelle épinière ?.....	43
a. Les difficultés liées à la moelle épinière	43
b. Le poids des lésions médullaires.....	44

<i>C/ L'étiologie de la SEP, une maladie plurifactorielle.....</i>	<i>45</i>
--	-----------

1) Des hypothèses physiopathologiques pour comprendre l'initiation de la SEP	46
Préambule : quelques notions de neuro-inflammation	46
Anatomie comparée du système immunitaire (SI) et du système nerveux central (SNC).....	46
Le statut immunologique du SNC.....	48
La neuro-inflammation, l'histoire d'un dialogue	50
a. La SEP est-elle une maladie auto-immune ?.....	51
L'auto-immunité, qu'est-ce que c'est ?.....	51
L'encéphalite allergique expérimentale (EAE), un modèle de la SEP.....	52
Qu'en est-il de la SEP ?	53
b. La SEP est-elle une maladie virale ?.....	55
L'hypothèse infectieuse.....	55
La démyélinisation induite par le virus de Theiler, un autre modèle de la SEP	56
De la réponse anti-virale à la réponse auto-immune ?	57
c. La SEP est-elle une maladie génétique ?.....	58
d. Des facteurs environnementaux mis en cause.....	59
e. La SEP est-elle une maladie neuro-dégénérative ?.....	61
2) Développement des lésions SEP : la balance neuro-inflammation/neuro-dégénérescence	62
a. L'inflammation, un moteur de la démyélinisation.....	62
Descriptions des lésions périvasculaires.....	62
Destruction des gaines de myéline par les macrophages et les cellules microgliales.....	62
Des lymphocytes T qui perdent le contrôle	63
Le rôle non négligeable des lymphocytes B.....	65
Des stratégies thérapeutiques prometteuses ?	66
b. L'atteinte neuronale, une atteinte primitive ?	68
L'échec des thérapies immuno-modulatrices	68
L'atteinte axonale en conséquence de la démyélinisation	68
Une atteinte primaire du neurone	71

L'atteinte des motoneurones	72
c. Les atteintes focales et diffuses, des frontières floues ?	73
L'atteinte diffuse du SNC	73
Les frontières plaques/SBAN	75
La notion de périplaque	75
La substance blanche d'apparence douteuse (SBAD)	75
II. LE DIALOGUE DES CELLULES GLIALES DANS LE DEVELOPPEMENT DES LESIONS SEP	78
A/ Les cellules gliales.....	78
1) Deux grands acteurs de la macroglie : oligodendrocyte et astrocyte	79
a. Les oligodendrocytes, des isolants déterminants	79
De beaux manteaux pour les neurones.....	79
Caractéristiques morphologiques des oligodendrocytes	79
Composition de la myéline	80
Formation des gaines de myéline	81
Les autres fonctions des oligodendrocytes.....	82
Oligodendrocytes et support trophique des axones	82
Oligodendrocytes et développement axonal	84
L'origine des oligodendrocytes	84
b. Les astrocytes, les étoiles de la glie.....	86
Du rôle de soutien au véritable acteur de la transmission neuronale	86
Caractéristiques morphologiques et diversité des astrocytes.....	86
Dès leur origine, les astrocytes participent au développement du SNC	88
L'astrocyte, le meilleur ami du neurone	88
Les astrocytes en conditions pathologiques.....	91
Astrogliose et cicatrice astrocytaire.....	91
Les fonctions immunes de l'astrocyte.....	92
2) Les mille facettes des cellules microgliales et des macrophages.....	94
a. Les cellules microgliales, les macrophages spécialisés du SNC.....	94
Les monocytes circulants, les macrophages tissulaires et les cellules microgliales.....	94
Approchons-nous des cellules microgliales	95
L'origine des cellules microgliales et des macrophages.....	97
L'activation microgliale et macrophagique.....	97
Un rôle décisif dans le développement.....	99
Plus que des veilleurs du système immunitaire	100
La régulation de l'activation microgliale	101
Les fonctions principales des cellules microgliales	102
b. L'évolution du concept de programme d'activation macrophagique et microgliale.....	103
M1 vs. M2, le point de vue classique.....	103
Vers une nomenclature plus fine.....	106
Diversité des profils macrophagiques/microgliaux dans la SEP.....	107
c. Qu'en est-il des autres pathologies neuro-inflammatoires ?.....	108
La balance neuro-inflammation/neuro-dégénérescence vue à travers d'autres exemples	108
L'établissement d'un contexte neuro-inflammatoire.....	108
Les profils d'activation macrophagique/microgliale en contexte neuro-dégénératif.....	110
Le cercle vicieux de la persistance de l'inflammation chronique.....	112
B/ Démyélinisation et atteinte neuronale dans la SEP : une action concertée des cellules gliales....	113
1) La démyélinisation classique.....	113
a. Des arguments pour un profil délétère des macrophages et cellules microgliales	113
b. Le profil M1, activateur des lymphocytes T	114
2) Une autre vision de la démyélinisation : l'atteinte des oligodendrocytes, une atteinte primaire ?.....	115
a. L'atteinte des oligodendrocytes dans la SEP	115
b. L'hypothèse de Barnett et Prineas.....	116
c. Vers de nouveaux modèles de la SEP.....	118
Des modèles toxiques d'atteintes oligodendrocytaires.....	118
Les modèles de dégénérescence des oligodendrocytes	118
3) Altérations fonctionnelles des cellules gliales dans la SEP	119
a. Des altérations astrocytaires	119
b. Une dérégulation microgliale	120
Formation des nodules microgliaux	120
Les nodules microgliaux, des lésions pré-actives ?	122
3) L'atteinte neuronale par les cellules gliales	123
a. En conséquence de l'atteinte oligodendrocytaire	123

b. En conséquence des perturbations astrocytaires.....	123
c. En conséquences des perturbations microgliales.....	124
<i>D/ Réparation tissulaire dans la SEP : le rôle des cellules gliales.....</i>	<i>125</i>
1) Des acteurs de la réparation tissulaire dans le SNC.....	125
a. Les mécanismes de remyélinisation.....	125
b. Le rôle protecteur des cellules microgliales et des macrophages : un profil M2 en faveur de la remyélinisation.....	127
c. Le rôle protecteur des astrocytes.....	129
2) Pourquoi la remyélinisation échoue-t-elle dans la SEP ?.....	130
3) Les thérapies régénératives.....	130
QUESTIONS CLES - OBJECTIFS.....	132
RESULTATS.....	135
I. ACTIVATION MACROPHAGIQUE/MICROGLIALE SPECIFIQUE DES PERIPLAQUES LESIONNELLES DE LA MOELLE EPINIÈRE DES PATIENTS SEP : UN NOUVEL ASPECT DE LA DEMYELINISATION.....	136
<i>A/ Contexte du travail.....</i>	<i>137</i>
<i>B/ Résultats principaux du travail.....</i>	<i>138</i>
<i>C/ Article 1 et résultats associés.....</i>	<i>139</i>
A SPECIFIC MACROPHAGE/MICROGLIA ACTIVATION PROGRAM IN PERIPLAQUE REGIONS OF PROGRESSIVE MS SPINAL CORDS: A NOVEL ASPECT OF DEMYELINATION.....	140
1) Context of the work.....	141
2) Main results of the work.....	142
3) Characterization and choice of MS samples.....	143
a. A collaboration with the UK MS tissue bank.....	143
b. Clinical data and selection of MS patients.....	143
c. Characterization of MS samples.....	145
Localization of demyelinated lesions: MOG-staining.....	145
Classification of demyelinated plaques: ORO-staining.....	145
d. Choice of MS samples for histological and molecular studies of PDLs.....	147
4) Material and methods.....	150
a. Cases and <i>post-mortem</i> material:.....	150
b. Histological analyses.....	152
c. Molecular analyses.....	155
d. Statistical analysis.....	160
5) Histological and molecular characterisation of periplaque demyelinating lesions (PDLs).....	160
a. PDLs are extensive around spinal cord lesions.....	160
b. Attempts of 3D reconstruction of PDLs.....	162
c. PDLs, a widespread phenomenon.....	164
d. PDLs vs. NAWM molecular comparisons.....	164
e. Myelinic and axonal alterations of PDLs.....	168
6) Macrophagic/microglial response in PDLs.....	171
a. Macrophagic and microglial accumulation.....	171
b. Microglial nodules are frequent in PDLs.....	171
7) Inflammation and glial remodeling in PDLs.....	174
a. A low-grade inflammatory process occurs in PDLs.....	174
b. Chronic activation of macrophages/microglia.....	177
b. Abnormal astrocyte molecular signature in PDLs.....	178
8) Discussion.....	181
II. LES PROGRAMMES D'ACTIVATION MACROPHAGIQUE/MICROGLIALE DANS LES PATHOLOGIES A COMPOSANTES NEURO-INFLAMMATOIRES ET NEURO-DEGENERATIVES : IDENTIFICATION DE SIGNATURES COMMUNES VS. SPECIFIQUES PAR UNE APPROCHE <i>IN SILICO</i>	185
<i>A/ Contexte du travail.....</i>	<i>186</i>
<i>B/ Résultats principaux du travail.....</i>	<i>189</i>
<i>C/ Article 2 et résultats associés.....</i>	<i>190</i>

COMMUN VS. DISEASE-SPECIFIC MACROPHAGE/MICROGLIA ACTIVATION PROGRAMS IN HUMAN NEUROINFLAMMATORY AND NEURODEGENERATIVE DISORDERS: IDENTIFICATION BY AN <i>IN SILICO</i> ANALYSIS.....	191
1) Context of the work	192
2) Main results of the work.....	193
3) Material and methods.....	194
4) Analyses of macrophagic/microglial activation programmes	201
a. A shared macrophage/microglia activation program across CNS conditions: the common inflammatory denominator	201
b. Disease-specific macrophage/microglia molecular signatures.....	203
5) Discussion	208
6) Additional tables.....	211
DISCUSSION GENERALE ET PERSPECTIVES.....	219
A. LES PROFILS D'ACTIVATION MACROPHAGIQUE/MICROGLIALE DANS LA SEP	221
1) <i>L'identification des profils d'activation : critique de la méthode</i>	<i>221</i>
Vers une compréhension des mécanismes cellulaires de l'altération tissulaire	222
Le choix d'échantillons <i>post-mortem</i> de qualité pour les analyses transcriptomiques	222
Les limites associées à l'étude d'échantillons <i>post-mortem</i>	224
Une impossible distinction entre macrophages et cellules microgliales.....	224
Pertinence de la nomenclature M1 vs. M2 ?.....	225
L'analyse des données transcriptomiques.....	226
De l'application de la microdissection virtuelle aux LDP.....	227
Des limites de la microdissection virtuelle appliquées aux données de puces d'expression	228
2) <i>Des résultats : l'activation macrophagique/microgliale dans la SEP.....</i>	<i>229</i>
...au sein des LDP.....	229
... et au sein des lésions corticales	231
Une activation rémanente commune aux LDP et aux lésions corticales : la notion de « priming »	235
Une plasticité d'activation à l'origine des signatures moléculaires spécifiques de chaque pathologie neurodégénérative	236
Implications cliniques et directions futures	237
B. DE LA DYNAMIQUE DES PLAQUES	238
1) <i>Plaque et PDL, quelle histoire ?!.....</i>	<i>238</i>
2) <i>Comment les lésions SEP sont-elles initiées ?</i>	<i>240</i>
L'hypothèse vasculaire	240
Les nodules microgliaux forment-ils des lésions pré-actives ?	241
Les altérations diffuses, la SBAD et les LDP, une même entité ?	242
L'atteinte primitive de la myéline	243
3) <i>Comment les lésions SEP s'étendent-elles ?</i>	<i>244</i>
Les mécanismes classiques.....	244
Pourquoi certaines lésions SEP stoppent-elles leur progression ?	245
Les LDP, une forme chronique d'extension des lésions ?	245
L'atteinte astrocytaire trop longtemps oubliée	246
4) <i>Implications cliniques et directions futures des LDP</i>	<i>248</i>
5) <i>Et si les lésions de la moelle épinière étaient différentes de celles du cerveau ?.....</i>	<i>249</i>
C. NEURO-INFLAMMATION VS. NEURO-DEGENERESCENCE DANS LA SEP	252
1) <i>Une balance omniprésente</i>	<i>252</i>
2) <i>La spécificité des formes progressives.....</i>	<i>254</i>
Formes progressives vs. formes rémittentes	254
Formes secondairement progressives vs. progressives d'emblée.....	255
CONCLUSION.....	256
REFERENCES.....	257
ANNEXE	283

Avant-propos

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie neuro-inflammatoire chronique, première cause de handicap chez le jeune adulte. Actuellement, aucun traitement ne freine l'aggravation des symptômes liée aux formes progressives de la maladie. Bien que connue, l'implication des macrophages et de la microglie dans les processus de démyélinisation et d'atteinte axonale doit être plus finement caractérisée. Ce d'autant plus que la plasticité fonctionnelle de ces cellules suggère une réponse spécifique selon la pathologie, la localisation des lésions et le stade évolutif de la maladie. Dans ce contexte, ce travail de thèse a consisté en une caractérisation moléculaire des programmes d'activation macrophagique et microgliale dans deux types d'altérations tissulaires identifiés dans le système nerveux central (SNC) des patients SEP : 1) les zones partiellement démyélinisées bordant les plaques de la moelle épinière et 2) les lésions corticales. Cette étude a été réalisée sur des tissus *post-mortem* de patients atteints de formes progressives, formes dans lesquelles les lésions médullaires et corticales sont nombreuses et impliquées dans le handicap progressif et irréversible.

Après des rappels bibliographiques sur la physiopathologie de la SEP et le rôle des différentes cellules gliales dans le SNC, nous présenterons les résultats de nos deux études. Dans l'ensemble, ces résultats suggèrent que l'activation chronique des macrophages et cellules microgliales contribue à l'extension à bas bruit des lésions médullaires et corticales pendant la phase progressive de la SEP et propose de nouvelles cibles thérapeutiques. Nous avons également identifié des spécificités moléculaires qui caractérisent l'activation macrophagique et microgliale au cours de la SEP, en comparant, à l'aide d'une approche *in silico*, les profils caractérisés à ceux observés dans cinq pathologies neuro-dégénératives à composantes inflammatoires : la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington et la schizophrénie. La page suivante présente les publications et les communications associées à mon travail de thèse.

Publications et communications relatives au travail de thèse

Lieury A, Chanal M, Androdias G, Reynolds R, Cavagna S, Giraudon P, Confavreux C, Nataf S. Tissue remodeling and chronic demyelination in periplaque regions of multiple sclerosis spinal cord lesions.

Article accepté dans *Glia* (Annexe).

Lieury A, Wierinckx A, Pays L, Reynolds R, Nataf S. *In silico* analysis identifies common vs. disease-specific macrophage/microglia activation programs in human CNS disorders.

Article en préparation.

Lieury A, Chanal M, Androdias G, Reynolds R, Cavagna S, Giraudon P, Confavreux C, Nataf S. Tissue remodeling and chronic demyelination in periplaque regions of multiple sclerosis spinal cord lesions.

Communication affichée au **23^{ème} congrès de l'ARSEP**, Paris, 23 Mai 2014.

Lieury A, Chanal M, Androdias G, Reynolds R, Cavagna S, Giraudon P, Confavreux C, Nataf S. Molecular immunopathology of periplaque demyelinating lesions.

Communication orale au **22^{ème} congrès de l'ARSEP**, Paris, 24 Mai 2013 et affichée au **11^{ème} congrès européen des cellules gliales EUROGLIA**, Berlin, 3 Juillet 2013.

Lieury A, Chanal M, Androdias G, Reynolds R, Confavreux C, Nataf S. Periplaques form extensive lesions in multiple sclerosis spinal cords.

Communication orale au **28^{ème} congrès de l'ECTRIMS**, Lyon, 11 Octobre 2012 et affichée au **21^{ème} congrès de l'ARSEP**, Paris, 1^{er} Juin 2012, et au **11^{ème} congrès de la Société des Neurosciences**, Lyon, 23 Mai 2013.

RAPPELS BIBLIOGRAPHIQUES

I. Etat des lieux d'une pathologie neuro-inflammatoire et neurodégénérative : la sclérose en plaques (SEP)

A/ La SEP en questions : une pathologie bien connue bien mal comprise

Qu'est-ce que la sclérose en plaques ou SEP ? Lorsque l'on pose cette question à des étudiants entre 18 et 25 ans, comme l'a réalisé en 2010 un sondage de l'Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP), seule la moitié d'entre eux sait que la SEP est une maladie neurologique. Les autres lui associent une maladie du sang, de la peau ou des voies respiratoires. Ce sondage révèle la part de méconnaissance voire de mystère qui continue d'entourer la SEP au XXI^{ème} siècle. Afin de rentrer progressivement dans le cœur du sujet et de permettre à des non-spécialistes de lire ce manuscrit, il est intéressant d'appréhender la SEP au travers du regard de biologistes qui ne sont pas impliqués dans ce domaine de recherche.

Quels sont les symptômes de la SEP ? L'annonce du diagnostic de SEP évoque souvent le fauteuil roulant après une perturbation lente de la marche. **Quelles sont les hypothèses pouvant expliquer ce déficit ? Un déficit moteur ou musculaire ? Une dégénérescence du tronc cérébral ? Un problème de la jonction neuromusculaire ou une compression de la moelle épinière ?**

Avec quelles autres pathologies la SEP peut-elle être confondue ? C'est sans doute l'image du fauteuil roulant qui fait associer la SEP à d'autres pathologies. La sclérose latérale amyotrophique (SLA), par exemple, est une dégénérescence sélective des motoneurones à partir de la jonction neuromusculaire entraînant une atrophie musculaire foudroyante. On peut aussi citer les myopathies ou les déficits musculaires, les lésions traumatiques, sections ou compressions, de la moelle épinière.

Où se trouvent les lésions caractéristiques de la SEP et quel organe est atteint ? Est-ce une atteinte du système nerveux périphérique (SNP) ou central (SNC) ? De la moelle épinière ou du cerveau ? Des deux ? Quelles caractéristiques présentent les lésions ? Ces questions trouvent leur réponse dans les analyses histologiques et *post-mortem* de patients atteints de la SEP. Des coupes de cerveau ou de moelle épinière montrent des lésions de démyélinisation appelées plaques. Les données d'imagerie médicale montrent la présence d'œdème dans les plaques qui apparaissent sous forme de taches, suggérant une entrée anormale de plasma et de cellules immunitaires dans le tissu interstitiel. **Les lésions de la SEP sont-elles multiples ? Présentent-**

elles une localisation privilégiée ? Sont-elles définitives ? Sont-elles mortelles ? La maladie évolue-t-elle et pendant combien de temps ? Est-ce une maladie du vieillissement ?

Existe-t-il d'autres pathologies de la myéline ? Ces pathologies sont dites dysmyélinisantes, si elles résultent d'une malformation des gaines de myéline dès la naissance, ou démyélinisantes, si la destruction de la myéline intervient après sa formation. Il existe, par exemple, des leukodystrophies se manifestant par une hypo-myélinisation due à une mutation d'un gène codant pour les connexines impliquées dans le maintien des oligodendrocytes, les cellules myélinisantes du SNC.

Quelles sont les conséquences directes d'une démyélinisation ? Sachant que les gaines de myéline garantissent la conduction saltatoire des potentiels d'action le long des axones, le message nerveux est ralenti et moins efficace en cas de perte de myéline. Chez les patients atteints de SEP, les potentiels évoqués visuels, par exemple, mesure effective du message nerveux, sont ralentis en cas d'atteinte visuelle.

Est-ce que les nombreuses lésions de la SEP sont définitives ou évoluent dans le temps et l'espace ? L'atteinte de la SEP est multifocale. On parle de dissémination dans l'espace. Les lésions observées en imagerie à résonance magnétique (IRM) peuvent apparaître puis disparaître au fil des mois. C'est la notion de dissémination dans le temps. Les deux critères de dissémination dans l'espace et dans le temps sont importants pour le diagnostic. **Que cela suggère-t-il au niveau cellulaire ? Un processus de réparation cellulaire ? Une résorption de l'inflammation ?** En histologie, des plaques de remyélinisation sont notamment observées.

Est-ce que seule la myéline est atteinte ? Existe-t-il une atteinte des axones ? Des signes de neuro-dégénérescence ? Une atteinte axonale pourrait être soit directement due à la perte de myéline soit totalement indépendante. Des bourgeons d'axones sectionnés sont effectivement observés au niveau des plaques de démyélinisation. On observe également une perte axonale diffuse dans la SEP mais pas uniquement au niveau des plaques.

Existe-t-il une composante inflammatoire de la SEP ? Quelles cellules se retrouvent au niveau des lésions de démyélinisation ? S'agit-il de cellules immunitaires, en particulier macrophages ou cellules microgliales, ou bien d'astrocytes ? L'observation des lésions bordées de macrophages et infiltrées de lymphocytes T (LT) a très vite conduit à suspecter les cellules immunitaires comme responsables de la destruction de la myéline. Les macrophages ont d'ailleurs été pris en « flagrant délit » de phagocytose des débris myéliniques. **Ont-ils un rôle de nettoyage de la myéline abimée ou, au contraire, sont-ils de véritables destructeurs ?** L'inflammation du liquide céphalo-rachidien (LCR) est également riche en informations. On y observe un enrichissement cellulaire et protéique, notamment en anticorps. **L'attaque par les cellules**

immunes est-elle spécifique ou généralisée? Certains des anticorps retrouvés dans le sérum ou le LCR des patients sont dirigés contre le « soi¹ », signe d'une maladie auto-immune.

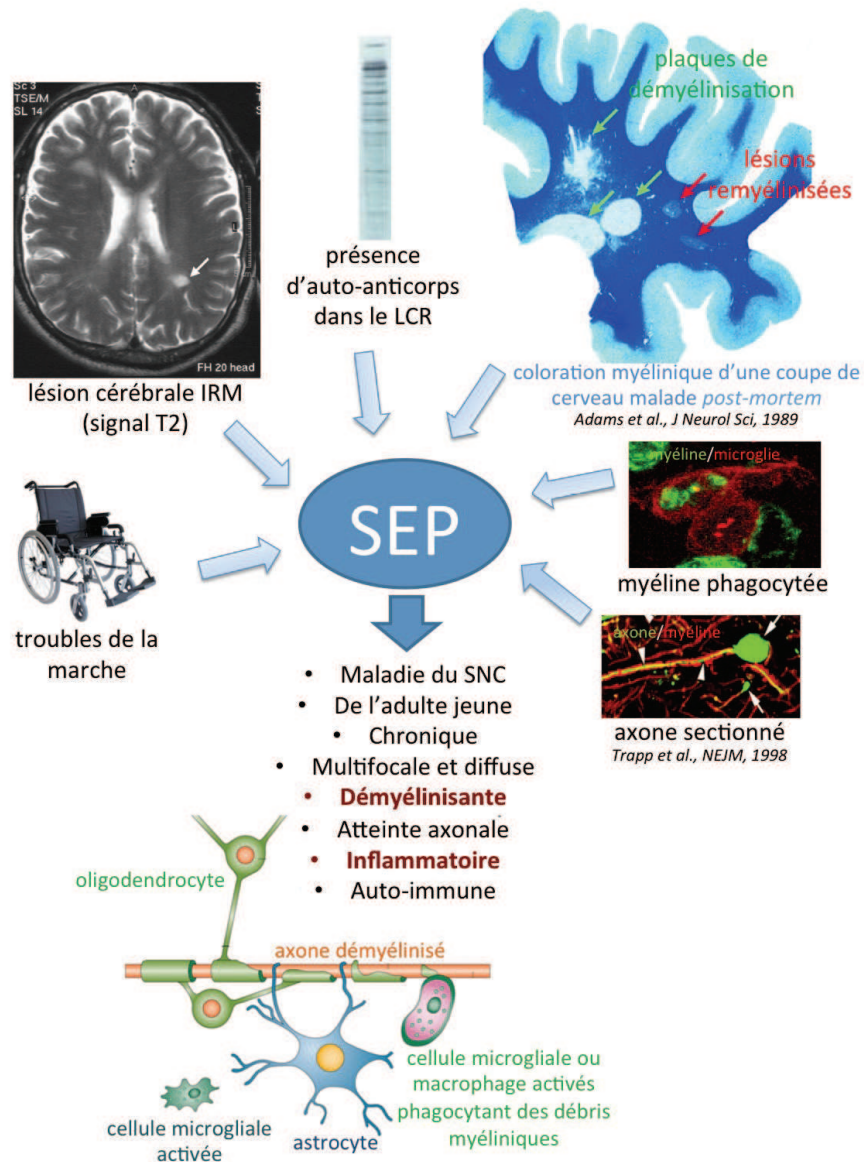


Figure 1 : Une première approche de la SEP.

C'est ainsi que notre vision de la SEP s'éclaircit depuis des années, en se posant les bonnes questions, en cherchant petit à petit les réponses. En première approche, la SEP est une maladie du SNC affectant le jeune adulte (Fig. 1). Elle évolue durant de nombreuses années et est donc qualifiée de chronique. De nature inflammatoire, de part la présence d'œdème et d'infiltration de cellules immunitaires, la SEP est une maladie démyélinisante multifocale. Cependant, une atteinte plus diffuse du tissu nerveux se manifeste dans son ensemble. Les lésions sont disséminées dans l'espace mais aussi dans le temps. Longtemps

¹ En immunologie, les antigènes du « soi » désignent les molécules produites par l'organisme en conditions physiologiques par opposition aux antigènes du « non-soi ». La réponse auto-immune est caractérisée par une rupture de la tolérance immunitaire des antigènes du « soi ».

décrite comme une maladie auto-immune, de part la présence d'auto-anticorps et l'attaque de la myéline par les cellules immunitaires, la SEP et sa nature inflammatoire s'avèrent bien plus complexes et ne sont toujours pas parfaitement comprises aujourd'hui. Ces questions successives, plus ou moins naïves, trouveront quelques réponses dans la suite de cette thèse même si, on le comprendra bien assez vite, elles ouvrent parfois plus de portes qu'elles n'en referment. De fait, si les hypothèses physiopathologiques de la SEP sont aujourd'hui nombreuses, la cause initiale de la maladie reste inconnue.

Les rappels bibliographiques présentés par la suite s'attacheront à décrire la neuropathologie de la SEP avant d'exposer les hypothèses cellulaires, génétiques ou environnementales, actuellement discutées dans la communauté scientifique. Cette partie donnera également l'occasion de présenter les différents modèles et techniques disponibles pour étudier les mécanismes physiopathologiques de la SEP.

B/ Clinique et neuropathologie de la SEP

1) L'histoire naturelle de la SEP

a. L'histoire de sa découverte

C'est à **Jean-Martin Charcot**, le fondateur de la neurologie moderne, que l'on doit la première définition de la SEP en 1868 (Fig. 2C). Pourtant, les premiers cas de SEP seraient apparus en Scandinavie vers le XI^{ème} siècle puis se seraient répandues à travers l'Europe à l'époque des Vikings. Ce n'est donc pas étonnant de retrouver des descriptions médicales évoquant les symptômes de la SEP dès le XIV^{ème} siècle. C'est le cas, par exemple, d'Hala, une jeune femme Viking qui souffrait de cécité et de troubles de la parole. Après s'être tournée vers la prière et le sacrifice, elle aurait récupéré en quelques jours. Était-ce un miracle ou le fruit d'une réparation tissulaire ? Les premières évocations de la SEP peuvent sembler tardives mais n'oublions pas qu'il s'agit d'une maladie du jeune adulte et que l'espérance moyenne de vie ne dépassait pas 30 ans avant l'an 1000.

En 1835, **Jean Cruveilhier**, anatomopathologiste français, décrivait des lésions caractéristiques du cerveau et de la moelle épinière dans son ouvrage *Anatomie pathologique du corps humain* (Fig. 2A). Au même moment, **Robert Carswell** décrivait ces lésions à Londres dans *Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease* (Carswell 1838; Murray 2009). Ce que l'on appelait à l'époque scléroses en taches ou en îles faisait sans aucun doute référence à la SEP (Fig. 2D,E). Les descriptions neuropathologistes se multiplièrent courant XIX^{ème}

siècle, notamment à l'hôpital parisien de la Salpêtrière qui a vu s'ancre en un demi siècle les fondements de la neurologie française (Fig. 2B). De grands hommes s'y succèdent. En particulier, **Alfred Vulpian** utilisa pour la première fois le terme de « sclérose en plaques » en 1866. La « **sclérose** » évoquait alors le durcissement des tissus dans les régions lésées du cerveau ou de la moelle épinière, et aux « **plaques** », correspondait la multiplicité des lésions focalisées. Ami de Charcot, ils publièrent leur description précise de la SEP en 1868 et se consacrèrent à l'étude physiopathologique des maladies du système nerveux. La SEP était alors associée à de vrais critères diagnostiques incluant une vision double ou diplopie, des troubles de la marche ou ataxie et des troubles de la parole ou dysarthrie. Charcot contribuera également beaucoup à l'étude des pathologies psychiatriques et de leurs bases neurologiques, il entrera à l'Académie des Sciences en 1883. Parmi ses élèves, **Pierre Marie** évoqua la possibilité d'une origine infectieuse de la SEP, hypothèse qui reste toujours d'actualité dans les recherches sur la SEP. De même, **Joseph Babinski** consacra un traité à la SEP en 1885.



Figure 2 : Historique de la SEP. **A.** En haut, Jean Cruveilhier en 1837, estampe gravée par Nicolas Eustache Maurin. En bas, Robert Carsell en 1835. **B.** Une leçon clinique à la Salpêtrière, peinture à l'huile d'André Brouillet, 1887, musée d'histoire de la médecine, Paris (photographie art: Pierre Prince, 2008). **C.** Jean-Martin Charcot et sa leçon sur la SEP. **D.** Dessins anatomiques de Robert Carswell montrant les taches de la moelle épinière. **E.** Dessins anatomiques de Jean Cruveilhier montrant les taches du cerveau. **F.** Identification des oligodendrocytes parmi les cellules gliales par Rio Hortega (Somjen 1988).

Au début du XX^{ème} siècle, la description des cellules gliales par **Rio del Hortega** (Somjen 1988), et en particulier celles des oligodendrocytes, a permis de décrire par la suite les processus de myélinisation/démyélinisation et remyélinisation, et d'avancer ainsi dans la compréhension des mécanismes physiopathologiques sous-jacents de la SEP (Fig. 2F). En 1933, la première

encéphalite allergique expérimentale (EAE) fut réalisée, s'imposant ensuite comme le modèle animal de la SEP et appuyant fortement l'hypothèse auto-immune. La SEP reste d'ailleurs aujourd'hui le plus souvent qualifiée de maladie auto-immune. D'autres hypothèses, que nous détaillerons par la suite, ont émergé à cette époque.

Depuis les années 60 en France, le **Professeur François Lhermitte**, les **Docteurs Jean Roux Delimal** et **Edmond Schuller** ont décidé de mettre en avant la SEP devant l'opinion et les pouvoirs publics. En mars 1969, l'ARSEP est fondée pour apporter un support financier aux chercheurs et aux cliniciens.

b. Résumé épidémiologique : une maladie fréquente du jeune adulte

Dans 70% des cas, la SEP débute chez le jeune adulte entre **20 et 40 ans** et l'on comprend donc la difficulté de l'annonce du diagnostic. Des manifestations pédiatriques de la SEP sont, elles, beaucoup plus rares. La SEP est la deuxième cause de handicap chez le **jeune adulte** après les accidents de la route. Ne modifiant pas ou très peu l'espérance de vie des patients, il est crucial d'améliorer les traitements et les solutions d'accompagnement. La prédominance du **ratio femme/homme** longtemps fixé à **2/1** augmenterait ces dernières années sans que l'on puisse l'expliquer.

Quelques chiffres sur la SEP en **France**. Entre **60 et 80 000 patients** sont touchés par la SEP, soit une prévalence² de **1/1000 habitant** (Fromont *et al.* 2009). Considérée comme la plus commune des maladies neurologiques invalidantes du jeune adulte, la SEP mobilise un budget annuel de 8 milliards d'euros. Entre 2500 et 4000 nouveaux cas apparaissent chaque année en France. Une étude menée à grande échelle sur 87% de la population entre 2001 et 2007 a réévalué l'incidence³ nationale et annuelle de la SEP à **7,5/100 000** (Fromont *et al.* 2010, 2012).

Enfin, la **distribution géographique** de la SEP est **hétérogène**. Une plus forte prévalence est observée dans les régions tempérées par rapport aux régions tropicales. Le risque associé serait bien lié aux quinze premières années de vie comme l'ont montré les études d'immigration. L'étude citée ci-dessus n'a pu confirmer la mise en évidence d'un gradient nord-sud en France (Vukusic *et al.* 2007), mais a bien montré une incidence plus élevée dans les départements du Nord-Est.

² Nombre d'individus malades relevés dans une population à un moment donné.

³ Nombre de nouveaux cas observés par an dans une population donnée.

c. Les formes d'évolution de la SEP : une ou plusieurs maladies ?

Une des particularités de la SEP est la diversité de ses manifestations cliniques, qui pourrait bien nous laisser croire à l'existence de plusieurs maladies. Seulement quatre formes d'évolution permettent de décrire l'ensemble des patients diagnostiqués (Lublin & Reingold 1996) (Fig. 3A) :

- La maladie débute par des **formes rémittentes** dans 85% des cas. Des phases de rémission s'y succèdent à des poussées laissant potentiellement des séquelles. Une **poussée** est définie par l'apparition subaiguë, en quelques heures à quelques jours, de nouveaux symptômes neurologiques en l'absence de fièvre, ou de leur aggravation, qui perdurent pendant au moins 24 heures. Deux poussées se séparent toujours d'au moins un mois et une poussée ne survient jamais de façon brutale, reflétant le caractère inflammatoire des lésions.
- Les 15% restant débutent leur maladie par une **forme progressive d'emblée**. La **progression**, par opposition à la poussée, se définit par une aggravation continue des symptômes neurologiques pendant au moins six mois.
- La moitié des patients à forme rémittente entre ensuite dans une **forme secondairement progressive**, en moyenne au bout de dix ans.
- Les **formes progressives avec poussées** existent également et sont plutôt rares.

Ces deux observations cliniques, les poussées et les phases de progression, suggèrent différents mécanismes biologiques sous-jacents. En effet, les traitements actuels anti-inflammatoires limitent uniquement la survenue des poussées mais ne semblent pas avoir d'effet sur la progression globale du handicap des patients. Ainsi, les poussées sont associées en première approche, à des épisodes inflammatoires et l'évolution lente, à des processus neuro-dégénératifs (Fig. 3B).

L'évolution des symptômes et le pronostic vital de la maladie sont extrêmement variables d'un individu à l'autre. Il est donc difficile de les prévoir à l'échelle individuelle. Néanmoins, être de sexe masculin, développer des formes progressives d'emblée ou présenter un délai court entre les deux premières poussées sont des facteurs de mauvais pronostic. D'autre part, des **études épidémiologiques lyonnaises** ont mis en valeur des tendances générales d'évolution de la maladie (Confavreux *et al.* 1980, 2000; Confavreux & Vukusic 2006). Dans ce type d'études, l'état d'avancée de la maladie est évalué pour chaque patient sur une échelle de score clinique, l'échelle de Kurtzke ou encore **Disability Status Scale** (DSS) (Fig. 3C) (Kurtzke 1983). Ils ont notamment montré que, en moyenne, la marche est perturbée huit ans après le diagnostic et que l'utilisation du fauteuil roulant est nécessaire trente ans après le diagnostic. Plus précisément, le nombre de poussées n'influencerait pas la vitesse de transition entre DSS4 et DSS7 que ce soit pour les formes rémittentes ou progressives. Enfin, l'âge du début de la phase progressive a lieu vers 40 ans, qu'il

s'agisse de formes progressives d'emblée ou secondaires. Le fait que ces tendances soient indépendantes des formes d'évolution, mais plutôt liées à l'âge, minimise le rôle des poussées dans l'accumulation à long terme du handicap.

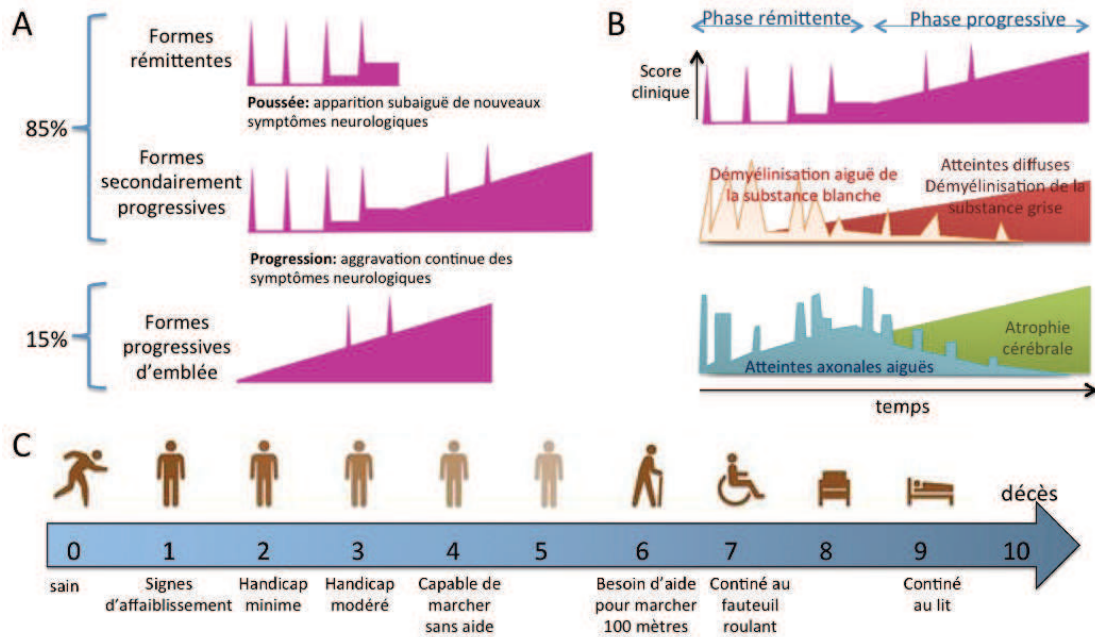


Figure 3 : L'évolution de la SEP. **A.** Les formes évolutives de la SEP. **B.** Corrélation entre les phases évolutives et les atteintes tissulaires de la SEP (adaptée de Siffrin *et al.* 2010). Les plaques de démyélinisation aiguë sont plus fréquentes pendant les épisodes inflammatoires puis diminuent avec le temps. La démyélinisation corticale augmente avec la progression du handicap. L'atrophie cérébrale augmente progressivement depuis le début de la maladie reflétant la perte tissulaire totale. **C.** L'échelle DSS des scores cliniques (*Disability Status Scale*).

Ces observations ont conduit les auteurs à suggérer l'hypothèse d'un mirage physiopathologique selon laquelle **deux phases cliniques** ne résulteraient pas nécessairement de **deux phases biologiques** séparées dans le temps (Vukusic & Confavreux 2007). En effet, il est probable que les mécanismes sous-jacents à la progression du handicap s'initient bien avant leur traduction clinique (Fig. 3B). De même, les mécanismes à l'origine des poussées n'influenceraient pas ou peu la phase progressive. Si l'on conduit cette dernière hypothèse à l'extrême, les formes progressives d'emblée de la SEP représenteraient la base commune physiopathologique de tous les patients. En ce sens, les formes progressives d'emblée ont été proposées comme la véritable SEP, uniquement de nature dégénérative, considérant la réponse inflammatoire et autoimmune comme secondaire et propre à chaque individu (Stys *et al.* 2012). A l'inverse, de part certaines particularités des formes progressives d'emblée, par exemple une absence du déséquilibre du sex-ratio, certains auteurs ne les considèrent pas comme appartenant à la SEP (Rice *et al.* 2013). Une dernière hypothèse insiste sur la distinction dans le temps des deux phases cliniques. Selon elle, toutes les formes décrites précédemment appartiennent à la SEP, qui s'exprimerait en deux phases, une phase précoce jusqu'au DSS3, qui se distingue de la phase tardive entre DSS3 à DSS6 (Leray *et al.* 2010).

Les poussées, le sexe et l'âge influenceraient la première phase sans en affecter la seconde (Scalfari *et al.* 2010). Ainsi, la première phase dépendrait de l'**inflammation focale**, repérée en IRM, le plus souvent pendant la phase rémittente. La seconde phase en serait indépendante mais liée à l'**inflammation diffuse** et la **dégénérescence**. En tout état de cause, l'hétérogénéité sémiologique de la SEP nécessite d'optimiser deux thérapeutiques différentes.

2) Comment diagnostiquer la SEP ?

a. Sémiologie de la SEP : des atteintes diverses

La multifocalité des lésions de la SEP implique des atteintes variées sur le plan clinique (Table 1) même s'il ne faut pas oublier que de nombreuses lésions restent silencieuses, c'est à dire sans manifestation clinique évidente. La plupart des patients débutent la pathologie par des **fourmillements dans les membres**, ou paresthésie (40%). La **névrite optique** et l'**atteinte motrice** représentent respectivement 30% et 25% des symptômes initiaux. Le **phénomène d'Uhthoff** est très souvent observé chez les patients SEP. Il s'agit de l'aggravation, par la chaleur, des symptômes qui deviennent plus douloureux. Depuis quelques années, les troubles cognitifs sont pris en considération puisqu'ils touchent la moitié des patients (Reuter *et al.* 2011).

Table 1: Sémiologie de la SEP.

Atteintes	Symptômes
Motrices	- Syndrome pyramidal, cérébelleux (statique ou cinétique), vestibulaire se manifestant par des troubles de la marche - Gêne motrice des membres supérieurs - Monoplégie, paraplégie, hémip légie
Sensitives	Troubles subjectifs principalement, paresthésies (fourmillement, engourdissement, picotement), dysesthésies (disparition ou exagération de la sensibilité au toucher, pouvant être douloureux), signe de Lhermitte (décharge électrique lorsque la colonne vertébrale est frappée), douleurs de type cordonal, syndrome lemniscal (ataxie aggravée par la suppression du contrôle visuel, la station debout pieds joints est instable aggravée par l'occlusion des yeux), douleurs
Visuelles	Névrite optique rétro-bulbaire
De l'extrémité céphalique	Ophthalmoplégie internucléaire, névralgie du trijumeau, paralysie faciale centrale ou périphérique
Sphinctériennes	Mictions impérieuses, fuites urinaires, dysurie, rétention urinaire, constipation et troubles sexuels
Cognitives	Syndrome dysexécutif, syndromes thymiques, syndrome dépressif, anosodiaphorie (indifférence d'un individu à sa propre maladie)
Générales	Crises d'épilepsie en phases tardives, asthénie (fatigue)

b. Des examens complémentaires nécessaires

Lorsque les symptômes cliniques ne suffisent pas à établir le diagnostic d'une SEP, des analyses complémentaires sont nécessaires. Il s'agit des données d'imagerie **IRM**, de l'analyse du **LCR** et des **potentiels évoqués**.

De l'apport des données IRM ou comment résoudre le paradoxe clinico-radiologique

L'imagerie par résonance magnétique (IRM), **encéphalique** et **médullaire**, est anormale dans plus de 90% des cas (Fig. 4). Les techniques d'**IRM conventionnelles** sont basées sur le phénomène de résonance magnétique nucléaire et les signaux recueillis dépendent de la quantité d'eau relative présente dans les tissus. La plus grande mobilité des protons et l'augmentation en eau des tissus lésés permettent de visualiser les plaques de démyélinisation des patients SEP sous forme d'**hypo-signaux T1** et d'**hyper-signaux T2** et **FLAIR**. Les séquences FLAIR permettent d'avoir des images pondérées en T2 tout en éliminant l'hyper-signal du LCR, permettant ainsi de mieux distinguer les lésions péri-ventriculaires. Ces séquences d'imagerie conventionnelle, utilisée actuellement en clinique, ont montré l'ampleur de l'**atteinte multifocale** de la **substance blanche** (SB). Dans la majorité des cas, les lésions sont multiples dès le premier épisode clinique et elles prédominent dans les régions péri-ventriculaires, le tronc cérébral, le cervelet et la moelle épinière. Ainsi, l'IRM, sans être spécifique, a révolutionné le diagnostic de SEP en permettant de confirmer les critères diagnostiques de dissémination des lésions dans l'espace mais aussi dans le temps.

Outre les **données morphométriques** des lésions, l'IRM permet de mettre en évidence le caractère **récent** ou **ancien** des lésions. Par exemple, les lésions observées en signal T1 **rehaussées par le gadolinium**, un produit de contraste injecté par voie intraveineuse, sont des lésions récentes et actives signant une rupture de la barrière hémato-encéphalique (BHE). Les lésions T1 non rehaussées au gadolinium sont des lésions anciennes ou chroniques, probablement d'anciennes lésions actives devenues cicatricielles, démontrant une perte tissulaire. Une atténuation du signal T1 refléterait au contraire un processus de réparation tissulaire. De façon plus générale, les données IRM ont permis de mesurer l'**atrophie cérébrale**, et plus récemment médullaire, à la fois due aux pertes tissulaires des lésions focalisées mais également aux altérations diffuses du tissu (Sanfilipo *et al.* 2006).

Dans le cas de la SEP, on parle habituellement de **paradoxe clinico-radiologique** pour désigner le fait que la charge lésionnelle du cerveau ne soit pas directement corrélée à l'évolution clinique (Barkhof 2002). Comment expliquer ce paradoxe ? Une première explication est que toutes les lésions ne sont pas détectées par l'imagerie conventionnelle, ce qui était notamment le cas des **lésions de la moelle épinière**, le pouvoir de résolution étant trop faible par rapport au diamètre de l'organe. Aujourd'hui, l'acquisition et le traitement des séquences IRM conventionnelles se sont considérablement améliorés. Ainsi, les lésions de la moelle épinière observées aujourd'hui ont plus de pertinence clinique étant donné les circuits neuronaux cruciaux concentrés dans la moelle (Bot *et al.* 2004; Stankiewicz *et al.* 2009). Une autre hypothèse serait que cette corrélation n'existe

effectivement pas, au moins dans les stades précoces, la localisation des lésions restant déterminante (Reuter *et al.* 2011). Le handicap des patients ne serait alors pas uniquement dû aux lésions focalisées mais aussi et peut-être principalement à l'**atteinte diffuse** de la SB qui n'est pas mesurée par IRM conventionnelle (Rovaris *et al.* 2001b; a).

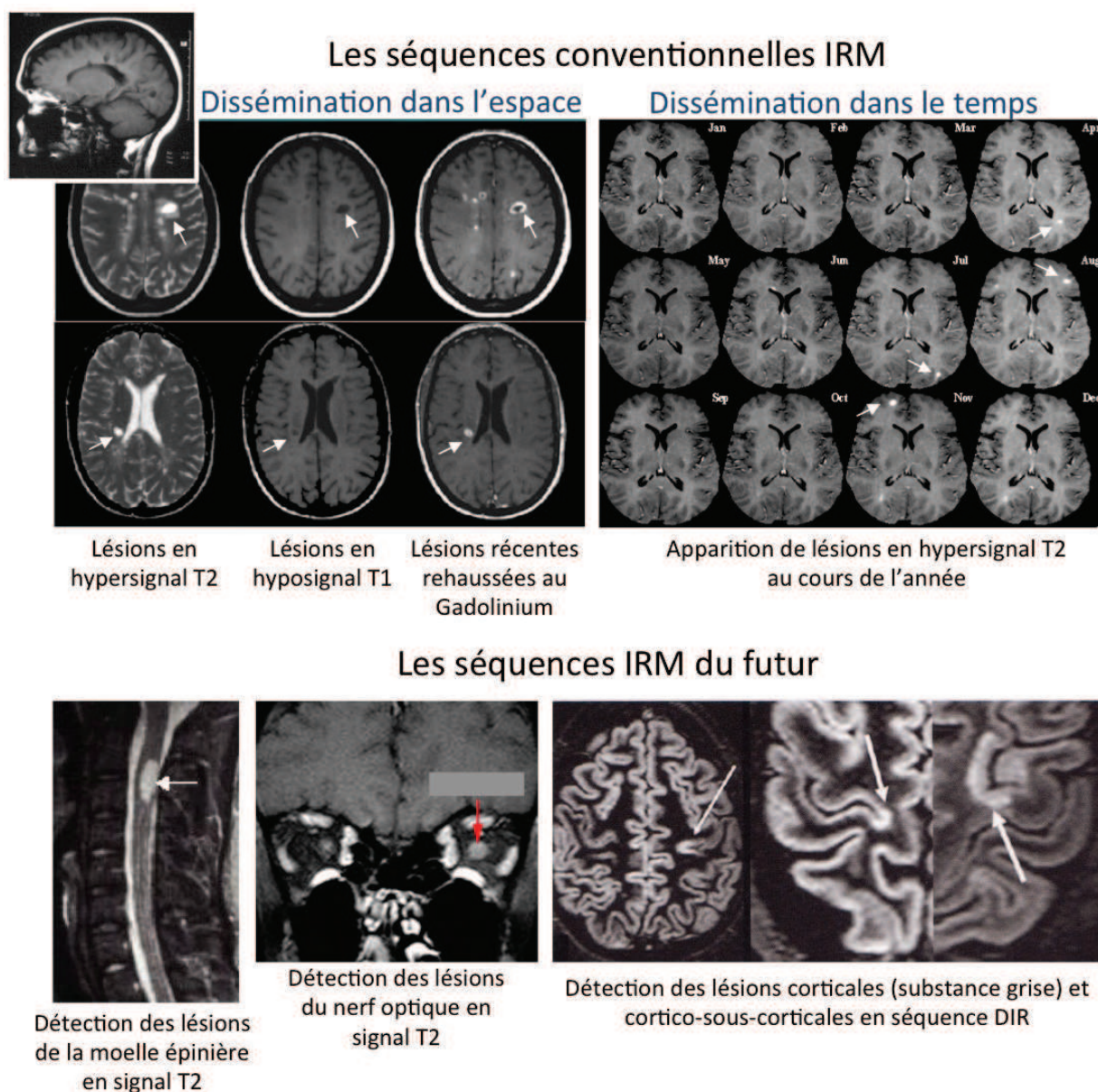


Figure 4 : Les lésions SEP observées en IRM conventionnelles et non conventionnelles. Les images IRM présentées ont été données par le Dr Marignier ou sont issues de Filippi and Rocca, 2010. Les flèches indiquent les signaux associés aux lésions SEP.

Actuellement, les nouvelles séquences d'acquisition IRM, ou **IRM non conventionnelles**, développées en recherche, permettent de détecter l'**atteinte diffuse** mais aussi de mettre en évidence de nouvelles lésions comme les **lésions corticales de la substance grise** (SG) (Fig. 4). En particulier, la séquence DIR (Double Inversion Récupération) optimise le signal du cortex. Les lésions corticales sont davantage corrélées au handicap des patients incluant des troubles cognitifs aux stades avancés (Calabrese *et al.* 2012). En parallèle, l'imagerie de transfert d'aimantation

(TTA) a révélé de **fines déstructurations tissulaires** dans la substance blanche d'apparence normale (SBAN), qui avait été désignée de la sorte à cause de son signal « normal » en imagerie conventionnelle (Pelletier 2012). On continue d'ailleurs de la désigner ainsi. De la même façon, la spectroscopie de résonance magnétique a montré des **variations métaboliques globales** de la SBAN : augmentation de la choline, signe de perte myélinique, et diminution du N-acétyl aspartate (NAA), signe d'une perturbation neuronale et astrocytaire. Enfin, l'imagerie de diffusion, ou tractographie, permet de visualiser des faisceaux de fibres nerveuses ayant en commun l'orientation du mouvement brownien de leurs molécules d'eau. En outre, les données d'IRM fonctionnelle (IRM_f) ont montré, dans la SEP, une **réorganisation fonctionnelle précoce** visant à compenser les pertes lésionnelles (Bonnet *et al.* 2010). L'hyperactivation du signal IRM_f des patients SEP par rapport aux témoins témoigne d'un recrutement compensatoire de la perte d'efficacité des faisceaux nerveux démyélinisés. L'ensemble de ces nouvelles données suggère que l'atteinte diffuse et les anomalies de connectivité structurale sont de meilleurs marqueurs prédictifs de l'évolution clinique des patients SEP, notamment dans le cas des troubles cognitifs.

L'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR)

L'analyse du LCR n'est pas indispensable pour établir le diagnostic mais une **ponction lombaire** est fortement recommandée en cas de diagnostic différentiel. Le LCR, produit par les plexus choroïdes, circule dans les ventricules et les méninges, transportant à la fois des protéines solubles et des cellules immunitaires (Fig. 5). Le LCR présente des anomalies chez la plupart des patients SEP : une augmentation anormale mais modérée du nombre de leucocytes (5-50/mm³), ou **pléiocytose** , est observée dans 40% des cas et une concentration élevée de protéines (0,4-1 g/L), ou **hyperprotéïnorachie** , dans 50% des cas. Un point décisif est la mise en évidence d'une **synthèse intra-thécale d'immunoglobulines⁴** (Ig) (index IgG > 0,70) et une **distribution oligoclonale des IgG** dans plus de 80% des cas. Ces IgG sont principalement dirigées contre des antigènes de myéline. Pour analyser le LCR, il est comparé au sérum du patient, contenant les protéines solubles du sang. Les protéines du LCR et du sérum sont purifiées et séparées sur un gel de migration afin de rechercher des bandes oligoclonales présentes dans le LCR et absentes, ou moins intenses, dans le sérum. La synthèse intra-thécale d'Ig est le témoin de la présence d'une population lymphoplasmocytaire intra-thécale productrice d'Ig. Il s'agit d'un marqueur de l'inflammation qui ne varie pas en fonction des poussées. Les rares cas négatifs pour ce test sont des SEP peu évolutives (Zeman *et al.* 1996; Annunziata *et al.* 2006). Les bandes oligoclonales constituent donc de

⁴ Les immunoglobulines sont les anticorps produits par les lymphocytes B activés, ou plasmocytes, en cas d'inflammation.

véritables marqueurs biologiques pour la SEP. Des bandes oligoclonales peuvent toutefois être retrouvées dans le LCR de patients atteints d'encéphalite infectieuse ou paranéoplasique, de méningite, du syndrome de Guillain-Barré...

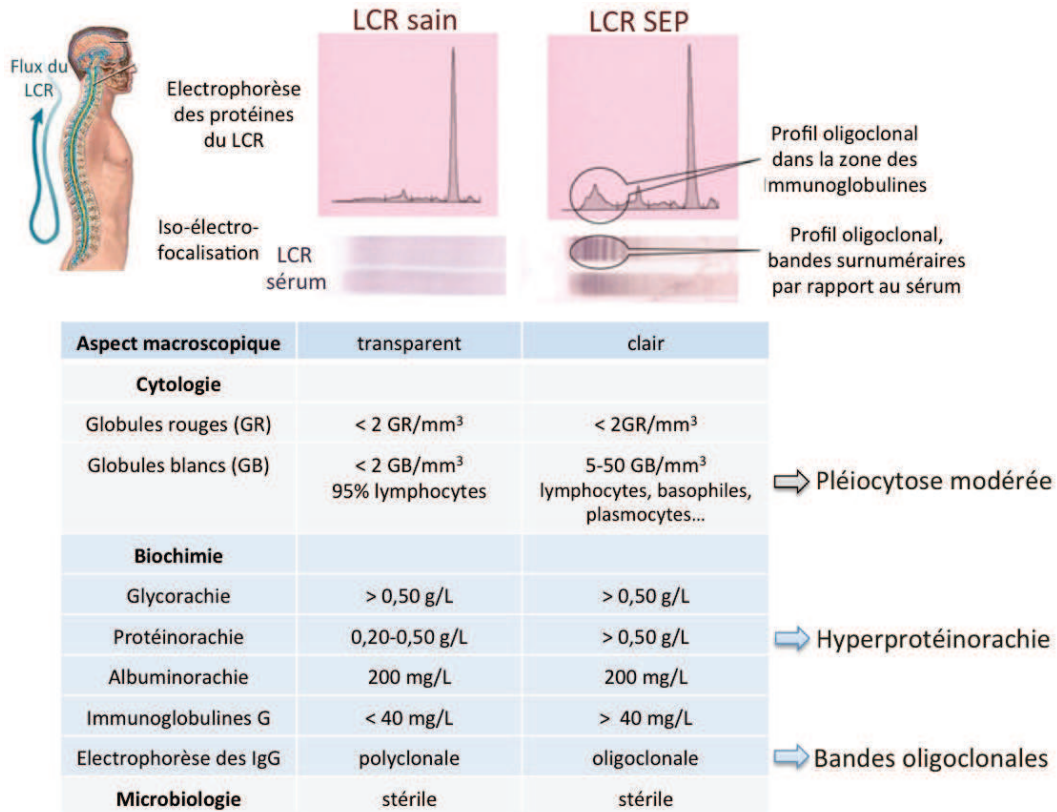


Figure 5 : Inflammation du LCR chez les patients SEP.

L'analyse des potentiels évoqués

Cette analyse est globalement peu utilisée mais peut s'avérer complémentaire dans certain cas, notamment pour argumenter la dissémination dans l'espace des lésions quand les critères cliniques et d'imagerie s'avèrent insuffisants. Ils permettent de montrer un **ralentissement et/ou une désynchronisation de l'influx nerveux**, probablement dus à une démyélinisation. Un retard de l'onde P100 des **voies visuelles** peut confirmer la suspicion d'une névrite optique rétro-bulbaire (NORB) (Fig. 6). Un retard des **ondes auditives** peut refléter une lésion du tronc cérébral. Les **potentiels évoqués somesthésiques** sont mesurés à la suite de stimulations électriques cutanées sur les doigts. Leur anomalie signe une ou des lésions des voies postérieures de la moelle épinière. Enfin, le retard des **potentiels évoqués moteurs**, témoin de l'activité du faisceau pyramidal, est déduit d'après la latence stimulation/contraction. Dans ce cas, une décharge magnétique est appliquée à différents niveaux de la moelle épinière provoquant une contraction musculaire involontaire.

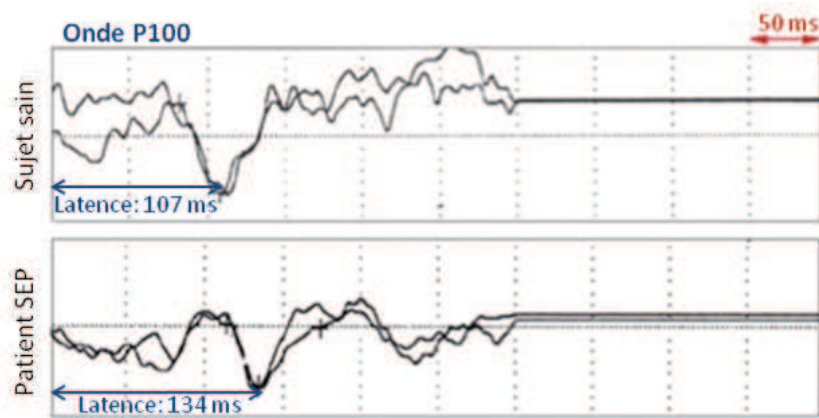


Figure 6 : L'analyse des potentiels évoqués visuels. Le temps de latence observé chez un patient SEP (en bas) est supérieur à celui observé chez un sujet sain (en haut).

c. Les critères diagnostiques

Il n'existe aucun test diagnostique spécifique de la SEP qui soit définitif. Le diagnostic positif repose donc sur des **listes de critères** établis lors des examens décrits précédemment :

- La **dissémination dans le temps** des lésions : au moins deux poussées séparées d'au moins un mois ou une évolution progressive sur six mois.
- La **dissémination dans l'espace** des lésions, prouvée par la clinique, l'IRM et/ou les potentiels évoqués.
- L'**inflammation chronique du SNC** signée par la synthèse intrathécale d'Ig.
- L'absence de syndrome inflammatoire systémique.
- L'absence d'une autre affection susceptible d'expliquer les signes observés.

Les **critères de Poser** (1983) évaluent le degré de certitude diagnostique selon ces critères. Des critères plus récents ont été proposés par **Mc Donald en 2001** et révisés en 2010 (Polman *et al.* 2005, 2011) (Fig. 7).

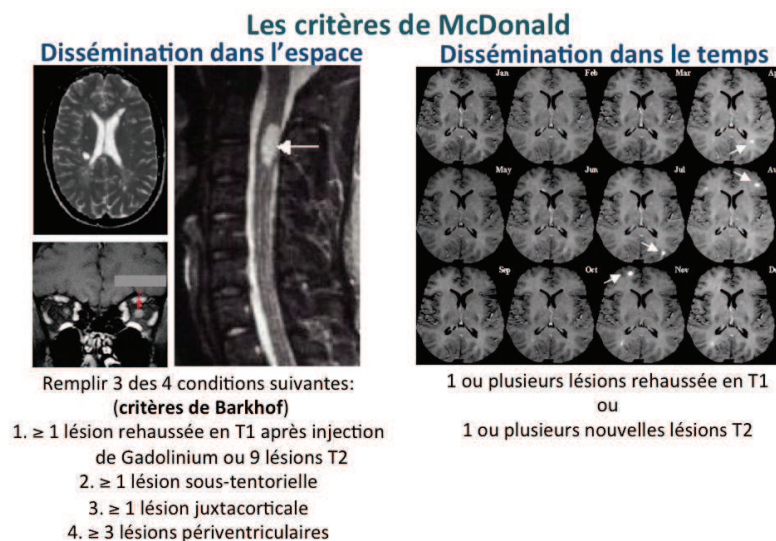


Figure 7 : Application des critères de Mc Donald à la suite d'une première poussée (Pelletier 2012).

En cas de diagnostic différentiel, puisque certaines pathologies peuvent mimer les anomalies cliniques, IRM et du LCR de la SEP, il faut les éliminer avant d'affirmer le diagnostic. Parmi ces pathologies, on retrouve principalement les vascularites du SNC, le lupus érythémateux disséminé, la polyarthrite rhumatoïde, le syndrome de Gougerot-Sjögren, la sarcoïdose, la maladie de Behçet, la maladie de Lyme, l'infection par le virus HTLV-1 et les adénoleucodystrophies. Néanmoins, ces autres pathologies sont souvent plus rares que la SEP. Les examens complémentaires ne sont donc pas multipliés inutilement.

3) Ce que nous apprennent les analyses de tissus SEP *post-mortem*

Des **banques européennes de tissus *post-mortem*** mettent à disposition des chercheurs des échantillons issus de patients SEP. Moelle épinière et cerveau sont disponibles par exemple à la banque de Londres (**United-Kingdom Multiple Sclerosis tissue bank**) avec laquelle nous avons collaboré activement pour réaliser notre première étude neuropathologique. Notre interlocuteur privilégié était le Professeur Richard Reynolds, responsable scientifique de la banque. Des banques spécialisées dans les liquides, type sérum ou LCR, sont plus répandues. L'intérêt de ses banques est le suivi rigoureux et l'association des données cliniques avec les échantillons récoltés selon une éthique prédéfinie.

La banque SEP londonienne fait partie d'un réseau européen, **BrainNet Europe (BNE)**, regroupant, depuis 2001, une vingtaine de banques de tissus cérébraux. L'objectif de ce consortium est de promouvoir les banques de cerveaux comme ressources biologiques pour la recherche européenne en neurosciences en fournissant des échantillons de la **meilleure qualité possible**. Sur le plan technique, le projet BNE a pour ambition d'optimiser les paramètres *pre-* et *post-mortem* nécessaires à la préservation de l'ADN, des ARN, des protéines et des substances chimiques des échantillons et de définir les limites des échantillons humains face au technique moléculaire de pointe. Des standards de références devraient voir le jour concernant le contrôle qualité des tissus et l'éthique des bonnes pratiques des banques de cerveaux. Cette structure est cruciale pour une recherche internationale de qualité dépendant de la disponibilité en échantillons de qualité validés sur le plan clinique et neuropathologique. Dans ce cadre, le réseau BNE a créé un jeu de données sans précédent d'ARN extrait d'échantillons de patients SEP ou d'autres pathologies du SNC et analysé sur puces d'expression génique. Nous avons pu bénéficier de l'accès à ce jeu de données et l'analyser avec une méthode originale dans notre seconde étude.

a. Les lésions de la substance blanche : les lésions classiques de la SEP

Les plaques de démyélinisation

Après une coloration de la myéline, au Luxol Fast Blue (LFB) ou par un immuno-marquage dirigé contre des protéines de la myéline (Fig. 8A), on observe des **foyers de démyélinisation disséminés** dans la **substance blanche** (SB) que ce soit sur des coupes de cerveau ou de moelle épinière de patients SEP autopsiés (Fig. 8B). Ce sont ces foyers que l'on appelle « **plaques** ». Chacune d'entre elles semble évoluer indépendamment du point de vue de la démyélinisation ou de la remyélinisation, de l'inflammation et de la sclérose. La perte axonale plus ou moins intense des plaques est observée par immunomarquage des neurofilaments (NF) axonaux. Les plaques correspondent le plus souvent à des foyers d'inflammation prenant naissance autour d'un capillaire sanguin (Fog 1965). Les **infiltrats périvasculaires** de lymphocytes T et B sont en effet fréquents chez les patients SEP. Les LT CD8⁺, ou cytotoxiques, apparaissent les plus nombreux. L'**activation microgliale**, caractérisée par une forte expression des molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de type II (CMH II) est plus prononcée dans les plaques (Ferguson *et al.* 1997; Boven *et al.* 2006) (Fig. 8C).

En dehors de plaques de démyélinisation, un cerveau SEP présente à première vue un aspect relativement sain. On parle donc de **substance blanche ou grise d'apparence normale** (SBAN ou SGAN). Pourtant si l'on regarde de plus près, des anomalies diffuses sont détectables, comme nous le verrons par la suite.

Les lésions remyélinisées

La coloration bleue de la myéline décrite ci-dessus fait apparaître régulièrement des plaques d'un bleu moins intense (Fig. 8B). Il s'agit de **plaques remyélinisées** appelées aussi « **shadow** » **plaques** en anglais (Prineas & Connell 1979; Brück *et al.* 2003; Patrikios *et al.* 2006; Henderson *et al.* 2009). La première mise en évidence au microscope électronique de la remyélinisation dans les lésions SEP date de 1965 par **Perier et Grégoire**. Une remyélinisation complète restaure une gaine de myéline fonctionnelle (Smith *et al.* 1981), plus fine à l'observation. La mesure du **g-ratio**⁵ est utilisée pour comparer les gaines de myéline sur différents échantillons. Celui-ci est compris entre **0,6 et 0,7** chez les mammifères et supérieur à 0,7 en cas de remyélinisation. Les plaques en cours de remyélinisation ont aussi des contours flous par rapport aux lésions inactives à contours nets.

⁵ g-ratio : diamètre axonal/diamètre de l'axone myélinisé.

Seul un sous-groupe de patients SEP présente une remyélinisation extensive, du moins dans le cerveau (Patrikios *et al.* 2006), et même à des stades tardifs de la maladie (Patani *et al.* 2007). Dans la première étude, l'étendue de la remyélinisation apparaît corrélée à la durée de la maladie et à l'âge de décès, montrant son rôle bénéfique.

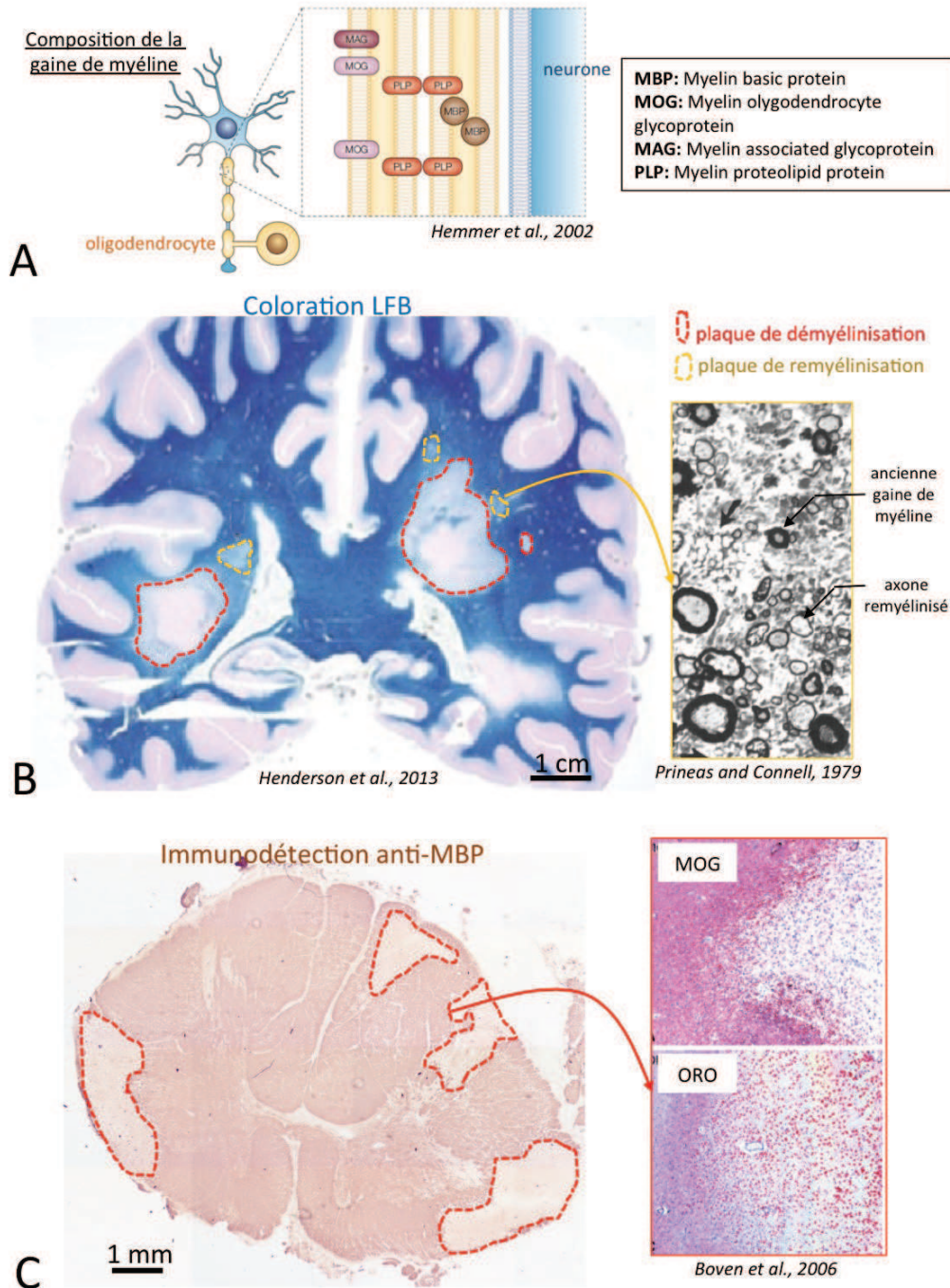


Figure 8 : Les plaques de démyélinisation et de remyélinisation. A. Composition de la myéline. B. Coloration myélinique au Luxol fast Blue (LFB) d'une coupe de cerveau *post-mortem*. L'absence de coloration révèle des plaques de démyélinisation dans la SB du cerveau (pointillé rouge). Des plaques de couleur plus claire, ou « shadow plaques » ont été remyélinisées (pointillé orange). L'encart montre une observation des gaines de myéline au microscope électronique dans une zone remyélinisée. Les gaines de myéline plus fines ont été nouvellement formées. C. Immuno-marquage anti-MBP d'une coupe de moelle épinière *post-mortem*. L'absence de marquage MBP délimite des plaques de démyélinisation. L'encart indique l'accumulation de macrophages ayant phagocyté des débris myéliniques (marquage ORO : Oil Red-O) en bordure d'une plaque délimitée par un immuno-marquage anti-MOG.

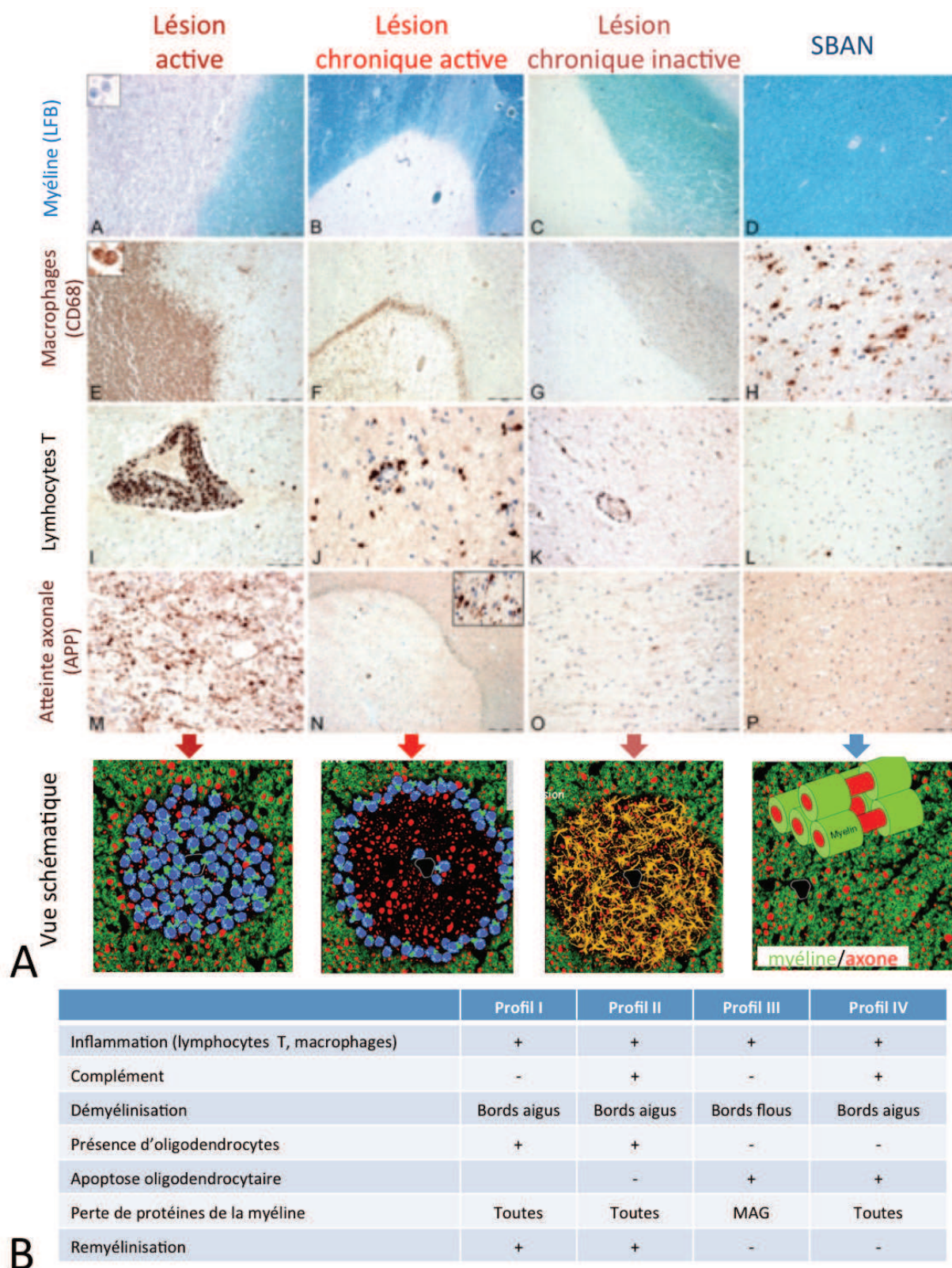


Figure 9 : Classifications des lésions SEP. **A.** Classification classique des plaques de démyélinisation. Les plaques, observées par une perte du marquage LFB, sont classées selon la densité macrophagique (CD68⁺) par opposition à la SBAN. Les infiltrats lymphocytaires sont plus nombreux dans les lésions actives ainsi que l'atteinte axonale (APP⁺ : *amyloid precursor protein*, marqueur de la dégénérescence axonale) (images extraites de Frischer *et al.* 2009). **B.** Classification de Lucchinetti (Lucchinetti *et al.* 2000). Les profils I et II sont centrés autour de vaisseaux et incluent les « shadow » plaques. Le profil II, le plus commun, est associé à un dépôt de complément et d'immunoglobulines G. Le profil III n'est pas centré autour d'un vaisseau et est associé à une mort oligodendrocytaire dans les bords actifs. Aucune remyélinisation n'est observée. Le profil IV est morphologiquement identique au I mais l'atteinte des oligodendrocytes y est plus marquée.

La classification des lésions SEP

Les plaques de démyélinisation SEP sont classées de façon classique en **trois types** : actives, chroniques actives et chroniques inactives (Ferguson *et al.* 1997; Frischer *et al.* 2009) (Fig. 9A). Ces différents types de plaques ne sont pas corrélés à la clinique puisque des lésions actives sont notamment observables chez des patients décédés en phase progressive, en dehors d'une phase de poussée. Les **lésions chroniques inactives** sont le plus fréquemment observées et sont caractérisées par une perte de myéline et des oligodendrocytes, un bord bien délimité, une faible infiltration de LT et une présence clairsemée de macrophages. L'astroglie, ou réaction astrocytaire, y est très intense. Les **lésions actives**, au contraire, sont moins fréquentes. Elles sont caractérisées par une perte de myéline, un bord plutôt flou et une infiltration forte de LT. Les macrophages sont nombreux dans l'ensemble de la plaque et remplis de débris myéliniques. Les oligodendrocytes apparaissent relativement préservés. De façon intermédiaire, les **lésions chroniques actives** présentent un centre inactif et un bord actif. Les macrophages se concentrent en périphérie de la lésion.

Une autre classification plus récente classe les plaques selon **quatre profils** qui discriminent les patients entre eux (Fig. 9B). Ici, toutes les plaques d'un patient présentent le même profil. La classification est basée majoritairement sur la présence de macrophages, de complément (facteurs solubles de l'inflammation innée) et la perte des oligodendrocytes par un mécanisme d'apoptose (Lucchinetti *et al.* 2000). Si cette hypothèse est vérifiée, elle suggère une hétérogénéité des patients et de la physiopathologie et donc des traitements à adapter selon les profils.

b. L'entrée en jeu des lésions corticales

Les lésions de la substance grise

Depuis ces dernières années, on sait que la perte myélinique n'est pas limitée à la SB mais qu'elle s'observe également dans la **substance grise** (SG) (Fig. 10A) (Brownell & Hughes 1962). Les **lésions corticales** de la SG sont souvent plus étendues que les lésions de la SB, du moins dans le cerveau et dans les formes progressives de la SEP (Fig. 10B) (Kutzelnigg *et al.* 2005; Popescu & Lucchinetti 2012). Certains patients présentent jusqu'à 70% de la SG atteinte (Kutzelnigg *et al.* 2005). Les lésions de la SG étaient faiblement détectées en IRM mais les nouvelles séquences d'acquisition, notamment les séquences DIR, ont augmenté la sensibilité (Kidd *et al.* 1999; Agosta *et al.* 2007b; Schmierer *et al.* 2010). Elles sont plus étroitement corrélées au handicap irréversible des patients que les lésions de la SB (Bø *et al.* 2003a; Kutzelnigg *et al.* 2005). Néanmoins, elles

apparaissent dès les phases précoces de la maladie (Lucchinetti *et al.* 2011). L'atteinte de la SG pourrait donc précéder celle de la SB.

Les lésions de la SG sont caractérisées par une **activation microgliale** importante (Gray *et al.* 2008). Il semble que les caractéristiques inflammatoires des lésions de la SG soient différentes de celles observées dans la SB. En particulier, les dépôts du complément et d'Ig sont peu fréquents (Brink *et al.* 2005). Les descriptions s'éloignent petit à petit de la description classique des lésions de la SB qui ne suffisent pas à expliquer les symptômes de la maladie, notamment en phase progressive. Est-ce qu'une **démyélinisation chronique** s'établit ? Est-ce que la perte axonale s'accroît ? Les lésions de la SG ont *a priori* de plus grandes conséquences cliniques, ou en tout cas, des conséquences distinctes des lésions de SB, puisqu'on y observe à la fois une atteinte myélinique et une perte des corps cellulaires neuronaux. Les marquages de la caspase 3 montrent un nombre relativement faible de neurones en apoptose à un instant donné, mais il faut considérer que cette **perte neuronale** s'accumule sur plusieurs décennies et conduit à une perte cumulée qui est sans doute majeure. La perte neuronale corticale est d'ailleurs corrélée à l'aggravation de la maladie (Magliozzi *et al.* 2010) et des troubles cognitifs (Calabrese *et al.* 2009).

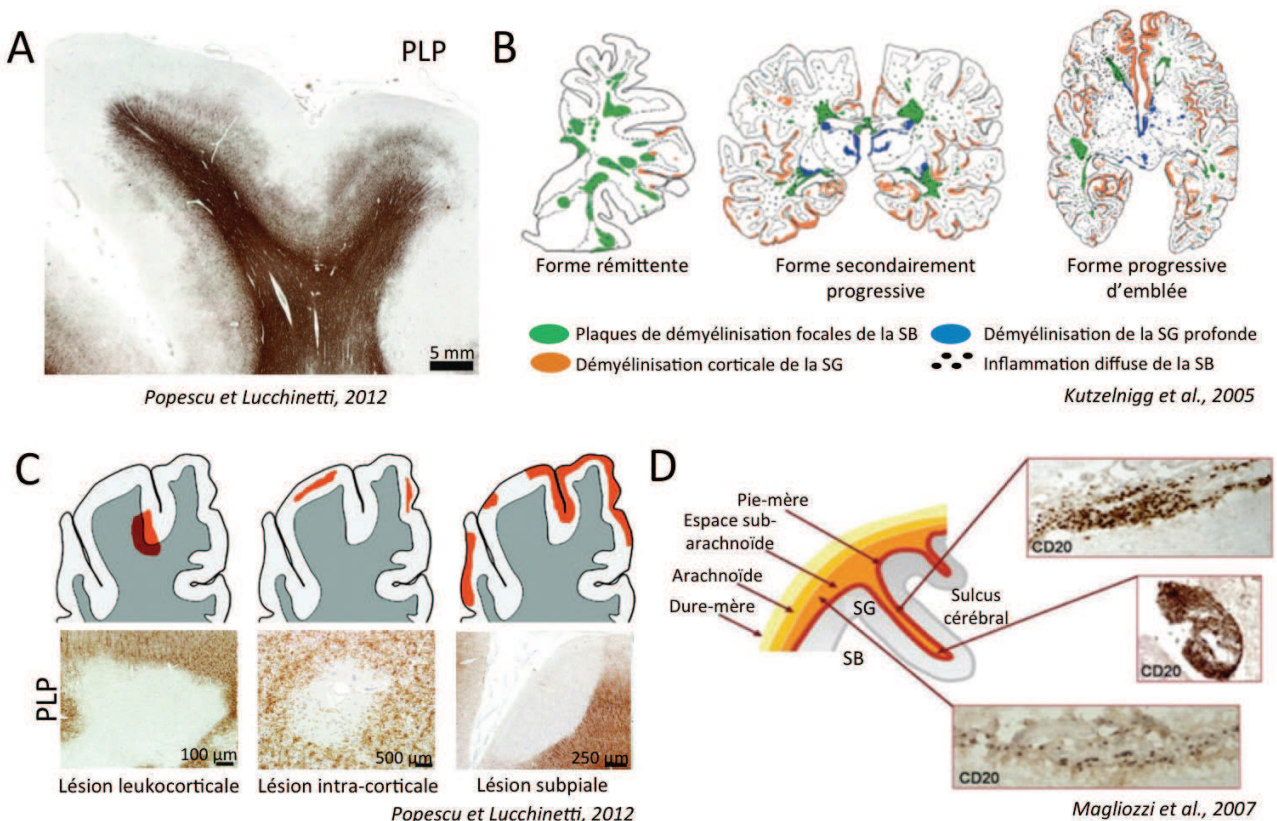


Figure 10 : Les lésions corticales. **A.** Exemple de démyélinisation corticale dans le lobe frontal (Immunomarquage PLP). **B.** Les lésions corticales sont plus nombreuses dans les formes progressives que dans les formes rémittentes de la SEP. **C.** Les différents types de lésions corticales. **D.** L'inflammation des méninges est associée aux lésions corticales. A noter la présence de follicules B (CD20⁺).

L'inflammation méningée

Très rapidement, un lien de causalité a été suspecté entre les lésions corticales et l'**inflammation des méninges** de part la proximité topographique des deux sites. En particulier, les lésions corticales sous-piales sont directement bordées par les méninges (Fig. 10C) (Bø *et al.* 2003a). Les méninges étant souvent absentes des échantillons, on peut comprendre que l'inflammation méningée ait longtemps été ignorée par les neuropathologistes. L'analyse des méninges a pu montrer que la démyélinisation de la SG était corrélée à la présence de **follicules B** dans les méninges (Fig. 10D) (Magliozzi *et al.* 2007; Howell *et al.* 2011). Dans cette étude, seulement 10% des patients ne présentent pas d'inflammation des méninges. Pour 40% des patients, elle est très importante et l'on observe des structures folliculaires B. Ces follicules B forment de véritables **structures lymphoïdes tertiaires**, contenant à la fois des lymphocytes B et T et des cellules dendritiques folliculaires, organisées en centres germinatifs. La présence de ces follicules augmenterait d'une part la production locale de TNF- α et d'IFN- γ dans les méninges, participant à l'amplification de la réponse inflammatoire. Ils seraient, d'autre part, le siège de la génération de plasmocytes et pourraient expliquer la synthèse intra-thécale d'Ig observée dans le LCR. De plus, la barrière méningo-encéphalique corticale est déjà très fine à ce niveau, notamment la glie *limitans* entre la SG et l'espace sous-arachnoïdien qui est endommagée en cas d'inflammation des méninges. Il n'est donc pas étonnant d'observer, à proximité de ces follicules, un gradient de microglie activée des *sulcus* vers le parenchyme, associé à un gradient de perte axonale. L'initiation de la SEP est plus précoce pour les patients qui ont développé des follicules et leur maladie a été plus sévère et plus courte (Howell *et al.* 2011). L'inflammation des méninges jouerait un rôle plus important dans les formes primitivement progressives (Choi *et al.* 2012). Ainsi, l'étendue de l'inflammation méningée apparaît étroitement liée à la pathologie corticale.

4) Pourquoi étudier les lésions de la moelle épinière ?

a. Les difficultés liées à la moelle épinière

La majorité des études physiopathologiques de la SEP décrivent le cerveau. Pourtant, il serait légitime de se poser la question suivante : qu'en est-il des lésions de la moelle épinière ? Partagent-elles les mêmes caractéristiques que celles du cerveau ? Comment expliquer le peu d'études les concernant ?

Elles ont d'abord été négligées en IRM pour des **raisons techniques** (Cohen-Adad *et al.* 2009, 2010). Le **faible diamètre** d'une section de moelle épinière humaine, un centimètre environ, requiert une très forte résolution spatiale qui n'était pas atteinte il y a quelques années (Tench *et al.*

2005). En effet, l'antenne radio-fréquence utilisée pour le corps, comparée à celle utilisée pour la tête, a une couverture pauvre et entraîne une réception moins sensible du signal. Les artéfacts classiques en imagerie sont également amplifiés. Les pulsations du LCR, ajoutées aux contractions cardiaques et aux mouvements respiratoires, augmentent les **artéfacts de mouvement**. La proximité avec les disques intervertébraux et les poumons produit des distorsions locales du champ magnétique et augmente les **artéfacts de susceptibilité**⁶ et de **troncature**. Les données IRM manquaient donc de spécificité, la faible qualité du signal ne permettant pas de distinguer la perte axonale de la démyélinisation. En conséquence, peu d'intérêt s'était porté aux lésions de la moelle épinière et les études histologiques étaient peu nombreuses (Nijeholt *et al.* 1998, 2001; DeLuca *et al.* 2006; Schirmer *et al.* 2009, 2011; Tallantyre *et al.* 2009, 2010). Pourtant, depuis les progrès de l'imagerie, il semblerait bien que les lésions médullaires ne puissent plus être ignorées plus longtemps (Poonawalla *et al.* 2008; Stankiewicz *et al.* 2009).

b. Le poids des lésions médullaires

On sait à présent que les lésions de la moelle épinière sont fréquentes. En effet, 83% des patients SEP présentent des anomalies IRM au niveau de la moelle (Bakshi *et al.* 1998) et 63% ont deux ou plus de deux lésions à ce niveau (Bot *et al.* 2004). La **moelle cervicale** semble davantage affectée que la partie thoracique. Plus de 90% des cas autopsiés, *post-mortem*, présentent des lésions de la moelle, suggérant soit un rôle de ces lésions dans la progression de la pathologie soit la signature d'une atteinte plus sévère. Certaines pathologies sont caractérisées par des lésions isolées de la moelle épinière en imagerie et posent parfois un problème de diagnostic même si la SEP est rarement responsable de lésions exclusivement médullaires type myélite transverse aiguë. Ce type de lésions extensives de la moelle, étendues sur plus de trois vertèbres, est plus souvent observé dans la neuromyélopathie liée au virus HTLV-1 (Virus de la leucémie T humaine) ou la maladie de Devic, aussi appelée neuromyéélite optique (NMO) (Jacob & Weinshenker 2008). Dans la SEP, les lésions T2 de la moelle s'étendent sur généralement **moins d'un segment médullaire**. Par ailleurs, l'atteinte médullaire serait un facteur prédictif de conversion en SEP chez les patients porteurs d'un syndrome radiologique isolé (Okuda *et al.* 2011; Ruet *et al.* 2011). C'est l'une des raisons pour lesquelles l'imagerie de la moelle épinière a été récemment incluse dans la révision des critères diagnostiques de McDonald (McDonald *et al.* 2001; Polman *et al.* 2005). Néanmoins, il manque encore une harmonisation et une standardisation des protocoles pour comparer les données qui ne sont pas encore homogènes entre les centres d'acquisition (Bot & Barkhof 2009). Le recours à

⁶ L'artéfact de susceptibilité se produit au niveau de l'interface entre deux matières de susceptibilité magnétique différente.

l'imagerie de la moelle est, pour le moment, encore trop souvent réservé aux situations où l'absence de lésions cérébrales ne permet pas d'établir le diagnostic de SEP (Bot & Barkhof 2009).

Il est vrai que les lésions du cerveau représentent 80% des lésions et celles de la moelle seulement 20%. Toutefois, il ne faut pas oublier, qu'en termes de masse et de volume, la moelle épinière ne représente qu'un faible pourcentage de l'ensemble du SNC (27 g sur 1,5 kg). Alors certes, les nouvelles lésions sont plus nombreuses dans le cerveau, mais relativement à sa masse, la moelle épinière est la région où la densité de lésions est la plus importante. Par ailleurs, **l'impact fonctionnel des lésions médullaires** est *a priori* plus important du fait de moindres capacités de réserve et de redondance fonctionnelle de la moelle par rapport au cerveau. Ainsi, les lésions IRM de la moelle sont le plus souvent symptomatiques ce qui n'est pas le cas pour les lésions cérébrales. C'est peut être pour cette raison qu'un certain nombre d'études suggèrent que la charge lésionnelle médullaire est plus étroitement corrélée au handicap que ne l'est la charge lésionnelle cérébrale (Stankiewicz *et al.* 2009). Par contre, il est actuellement admis que les lésions de la moelle sont impliquées dans les formes progressives de la maladie. Le ratio lésionnel moelle/cerveau est plus élevé dans les formes progressives de la SEP (Bramow *et al.* 2010). De la même façon, l'atrophie de la moelle, probablement due à la somme des lésions focales, de la perte axonale diffuse et de la dégénérescence Wallérienne, serait plus importante dans les formes secondairement progressives que dans les formes rémittentes (Horsfield *et al.* 2010; Klein *et al.* 2011).

En conclusion, la SEP est une maladie démyélinisante du SNC, résultant *a priori* d'une atteinte de la myéline qui précède les altérations axonales. Nous savons maintenant qu'il ne s'agit pas seulement d'une atteinte de la substance blanche mais aussi de la substance grise. Les causes possibles de la démyélinisation observée seront décrites dans les paragraphes suivants. Toutefois, les facteurs déclenchant de la SEP restent encore inconnus.

C/ L'étiologie de la SEP, une maladie plurifactorielle

Les paragraphes suivants visent à fournir des éléments concernant les hypothèses physiopathologiques de la SEP telles qu'elles sont actuellement proposées. Bien que les arguments soient nombreux, et la partie ci-dessous ne prétend pas être exhaustive, on ne peut toujours pas expliquer de façon certaine pourquoi certains individus développent une SEP. Dans les paragraphes précédents, nous nous sommes appuyés sur des données cliniques et épidémiologiques, des données IRM et des études anatomopathologistes. Nous allons ici nous laisser guider par des données similaires mais aussi par des méthodes variées utilisées en recherche fondamentale et préclinique pour argumenter les différentes hypothèses physiopathologiques de la SEP. Nous nous arrêterons en

particulier sur les modèles animaux de mécanismes auto-immuns ou dégénératifs et les modèles cellulaires qui ont permis de générer et/ou de tester ces hypothèses.

1) Des hypothèses physiopathologiques pour comprendre l'initiation de la SEP

Préambule : quelques notions de neuro-inflammation

Anatomie comparée du système immunitaire (SI) et du système nerveux central (SNC)

Quelques rappels sur le **système immunitaire** (SI) peuvent aider à une meilleure compréhension des mécanismes physiopathologiques de la SEP. SI et **système nerveux** (SN) ont fait l'objet de nombreuses comparaisons, tant et si bien que les connaissances de ces deux systèmes s'enrichissent mutuellement (Fig. 11). On peut se demander jusqu'à quel point les deux systèmes sont imbriqués l'un dans l'autre. La cellule microgliale est une cellule du SI résidente du SNC. Les cytokines, chefs d'orchestre de la communication du SI, sont aussi produites par les cellules du SNC et pourraient donc constituer le troisième système de communication du SNC après les neurotransmetteurs et les neuro-hormones (Sternberg 1997). Les systèmes de barrières appartiennent-ils au SNC ou au SI ? La SEP est un bon moyen pour comprendre que les deux systèmes ne sont pas si faciles à distinguer. Chacun des acteurs cellulaires présentés dans la figure 12 y trouvent sa place. Certains qualifient le SI comme le **6^{ème} sens du SNC**. A l'instar de l'ouïe, de l'odorat... il intègre des informations de l'extérieur comme la présence d'un pathogène imperceptible par les autres sens (Blalock 2005).

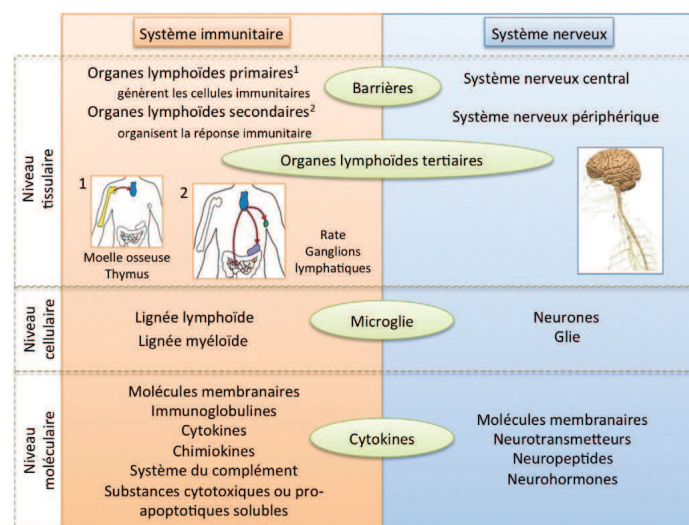


Figure 11 : Comparaison du SI et du SN. Les ronds verts indiquent les systèmes biologiques à l'interface du SI et du SN.

Pour rappel, la réponse immunitaire se scinde en deux phases (Fig. 13). La première phase, rapide mais peu efficace fait intervenir les acteurs de l'**immunité innée** : granulocytes, macrophages et cellules dendritiques. La seconde phase, plus lente mais spécifique, met en jeu l'**immunité adaptative** représentée par les lymphocytes. La cellule dendritique, en présentant les antigènes (cellule présentatrice d'antigène, CPA) aux LT, permet le passage d'une inflammation non spécifique à une réponse spécifiquement dirigée contre certains antigènes du « non soi », ou du « soi » en cas de réponse auto-immunitaire. A long terme, ou lors d'une inflammation chronique, l'ensemble des acteurs coopère sur le site de l'inflammation.

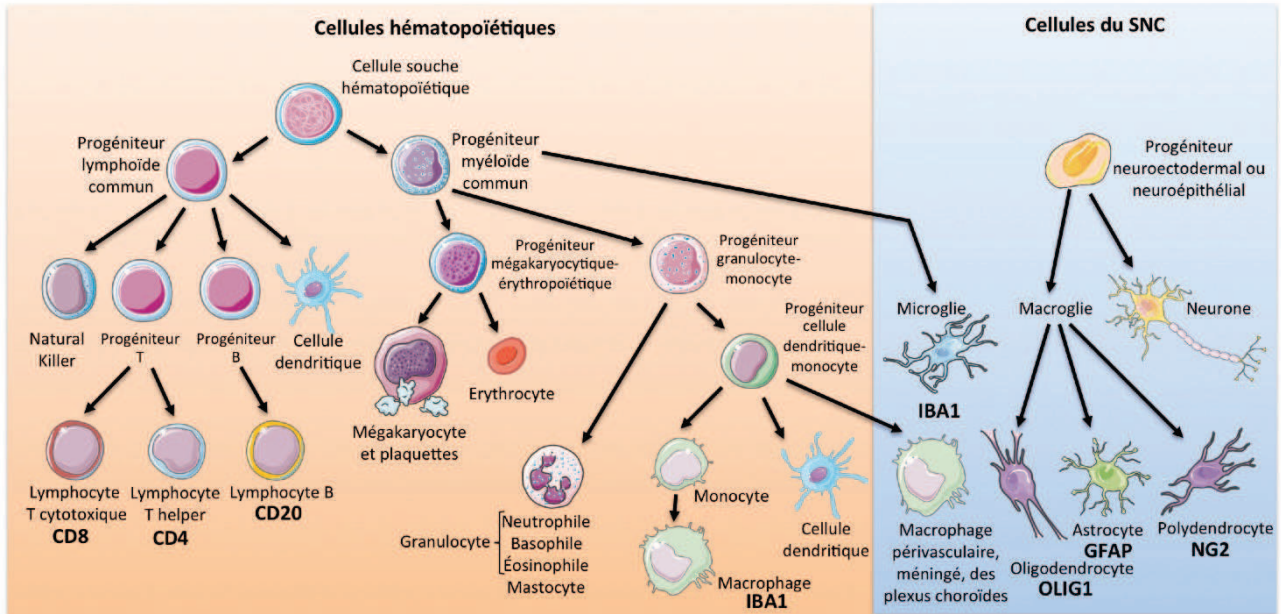


Figure 12 : Les cellules du SI et du SNC (figure adaptée de Ransohoff & Cardona 2010).

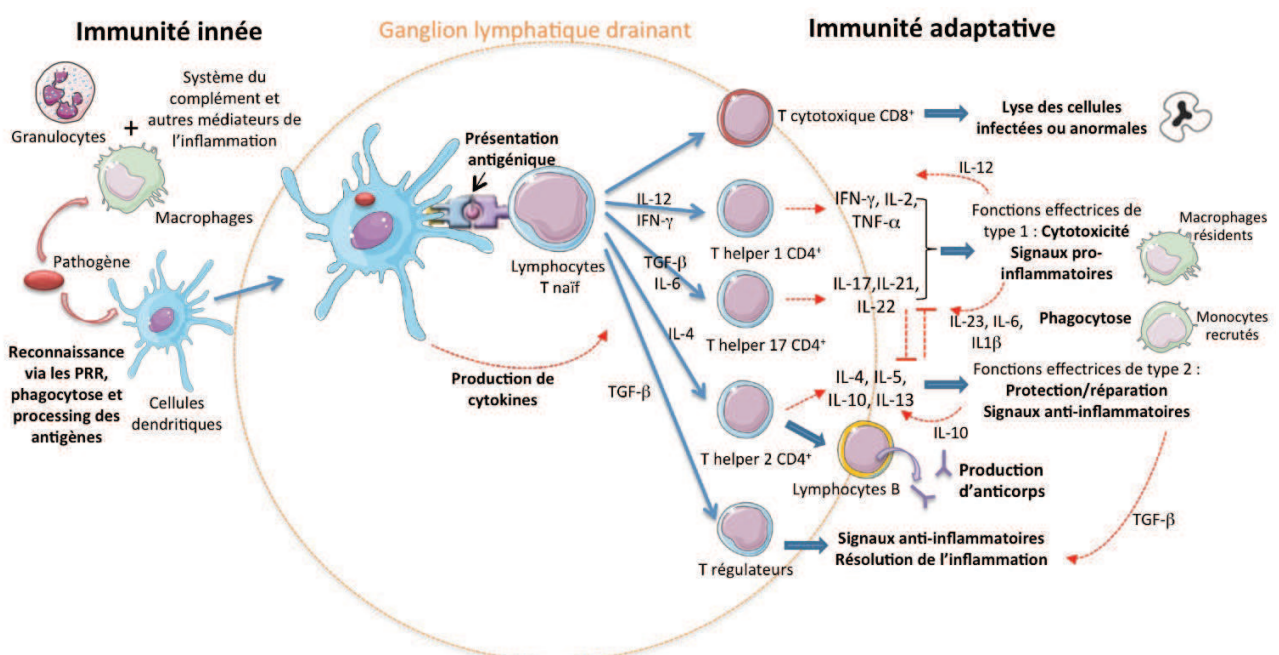


Figure 13 : La réponse immunitaire, une réponse finement orchestrée.

Le statut immunologique du SNC

Le cerveau était considéré comme un sanctuaire immuno-privilegié dans la mesure où une greffe n'y induisait que peu de rejet. L'expérience avait été réalisée en 1921 par Shiraï en transplantant des sarcomes de rat dans le parenchyme cérébral de souris (Medawar 1948). On ne parle plus de privilège immunitaire depuis que l'on sait qu'un dialogue permanent est établi entre le SI et le SNC. Le SNC est donc plutôt considéré comme un **site immuno-spécialisé** où la réponse immunitaire est possible et doit être des plus efficaces tout en étant le moins destructrice possible pour le tissu cérébral. C'est pourquoi, en conditions physiologiques, le SNC est protégé par différents systèmes afin d'éviter l'entrée de pathogènes et de mettre en place une réponse immunitaire efficace en cas de danger (Fig. 14).

Les barrières physiques incluent en premier les os du crâne mais également tout un ensemble d'interfaces tissulaires comprenant la **barrière hémato-encéphalique** (BHE ; sang/parenchyme cérébral ; Fig.14A), la **barrière hémato-méningée** (sang/LCR ; Fig. 14D) et la **barrière encéphalo-méningée** (parenchyme cérébral/LCR ; Fig. 14D). Ces barrières limitent l'entrée des pathogènes, des cellules immunitaires et des anticorps dans le SNC (Ransohoff *et al.* 2003). L'absence de drainage lymphatique du SNC ne permet pas la sortie des cellules immunitaires comme elle aurait lieu dans tout autre tissu. Il existe des niveaux variables de sélectivité des différentes barrières entre sang, LCR et parenchyme nerveux. On considère, en particulier, que la BHE est plus "hermétique" que la barrière hémato-méningée pour ce qui concerne le passage de cellules immunitaires. Ainsi, à l'état physiologique, des cellules immunes circulent dans le LCR dans lequel baigne l'ensemble du SNC. Le LCR est un flux continu, de sa production par les plexus choroïdes à sa résorption au niveau du sinus veineux en passant par la circulation via les espaces sous-arachnoïdiens.

Dans la conception actuelle du statut immuno-spécialisé du SNC, les cellules du parenchyme cérébral, en particulier les cellules gliales, maintiendraient de façon constante un **environnement anti-inflammatoire** en synthétisant notamment la molécule TGF- β et en favorisant les réponses T de type Th2 plutôt que Th1 (Fig. 14B). L'expression de Fas ligand par les cellules du parenchyme induit la mort des lymphocytes infiltrants qui expriment Fas à leur surface. De plus, la présentation antigénique est faible au sein du parenchyme cérébral. Les neurones en activité expriment faiblement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I et répriment l'expression microgliale et astrocytaire des CMH de classe II. En revanche, les macrophages périvasculaires, des méninges et des plexus choroïdes expriment normalement les CMH de classe II ce qui en fait des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) capables de déclencher une réponse immunitaire.

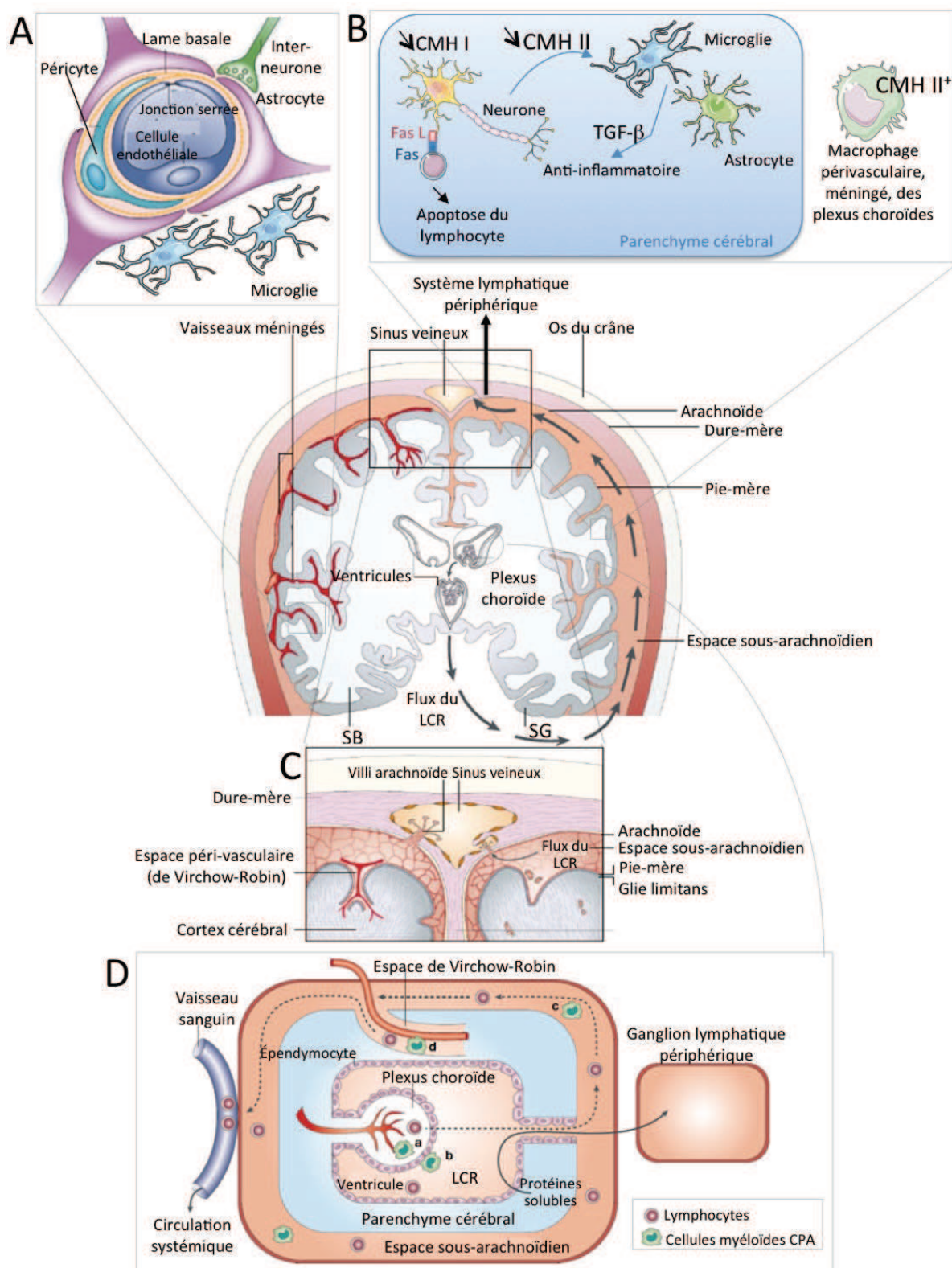


Figure 14 : Les systèmes de protection du SNC. Le schéma central montre la protection du SNC par ces barrières. Le LCR, produit par les plexus choroïdes, circulent dans les ventricules et les méninges via les espaces sous-arachnoïdiens (figure adaptée de Ransohoff *et al.* 2003). **A.** La barrière hémato-encéphalique (BHE) (adapté de Abbott *et al.* 2006). Les cellules endothéliales formant la paroi des capillaires sanguins sont étroitement liées par des jonctions serrées. Les capillaires sont recouverts de péricytes et de pieds astrocytaires. **B.** Le maintien d'un environnement anti-inflammatoire dans le parenchyme cérébral. **C.** Le LCR est résorbé au niveau du sinus veineux. **D.** Au sein des ventricules cérébraux résident les plexus choroïdes. A ce niveau, se trouvent les barrières hémato-méningée et encéphalo-méningée (adapté de Ransohoff *et al.* 2003).

La neuro-inflammation, l'histoire d'un dialogue

En conditions pathologiques, c'est-à-dire en situation, par exemple, d'infection du SNC, de tumeur cérébrale, de dégénérescence neuronale ou bien de réaction auto-immune dirigée contre un antigène du SNC, la quasi-totalité des acteurs de l'immunité vont intervenir et interagir avec les acteurs du SNC. Un **contexte neuro-inflammatoire** s'établit. Malheureusement, les pathologies du SNC les plus connues témoignent d'un échec du SI mais il faut considérer que la plupart des infections ou attaque du SNC sont évitées ou résorbées grâce à la finesse du dialogue qui s'établit entre les acteurs cellulaires des deux systèmes (Fig. 15A) (Ransohoff & Brown 2012). De telles interconnexions conduisent à penser que les deux systèmes ne peuvent pas fonctionner l'un sans l'autre et rendent d'autant plus difficiles la compréhension des processus de « **neuro-inflammation** ».

La neuro-inflammation résulte de la perturbation des systèmes de protection susdits. Elle est caractérisée par la libération et l'accumulation intrathécale de facteurs inflammatoires et par l'activation des cellules gliales (astrocytes et cellules microgliales) (Fig. 15B). Elle est souvent associée au recrutement de cellules immunitaires, à la rupture de la BHE et au maintien d'une inflammation périphérique. Le nouvel environnement inflammatoire auquel les cellules du SNC contribuent altère en retour leur activité (Lyman *et al.* 2013).

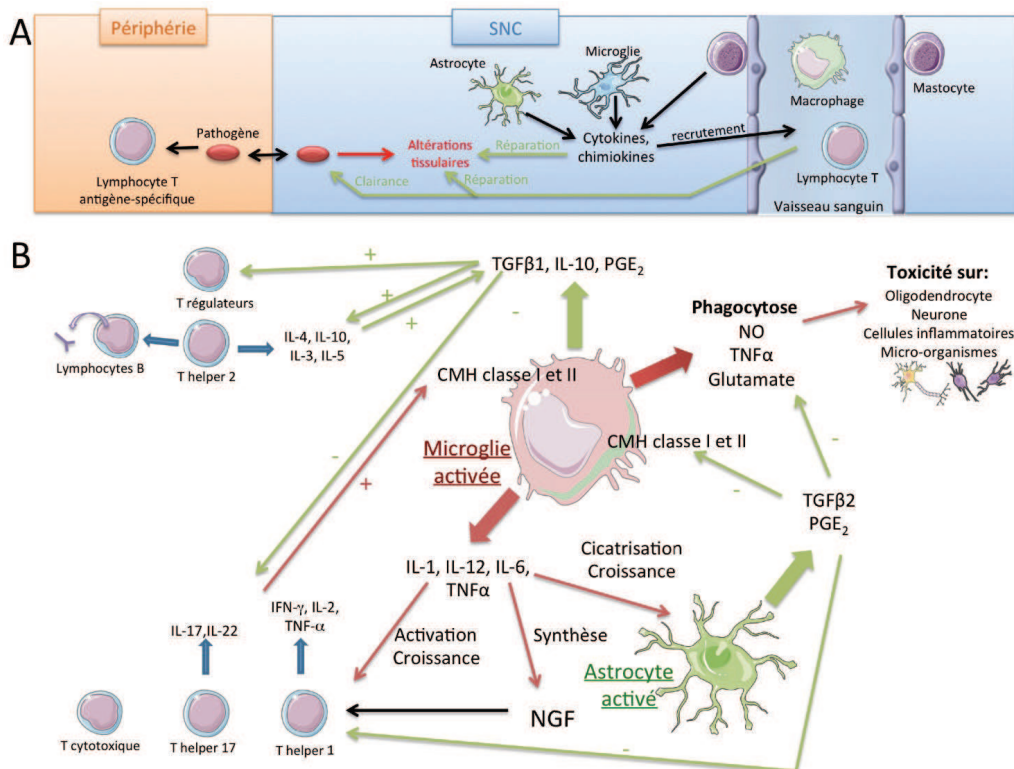


Figure 15 : La réponse immunitaire dans le SNC. **A.** La réponse immunitaire classique dans le SNC tend à réparer les atteintes tissulaires (adapté de Ransohoff & Brown 2012). **B.** Le schéma illustre la complexité du dialogue s'opérant entre les cellules gliales activées et les cellules immunes. La balance penche rapidement vers un excès de signaux pro-inflammatoires (flèches rouges) destructeurs pour les cellules du SNC.

Comment la réponse immunitaire est initiée dans le SNC reste peu connu. On sait que cette réponse immunitaire dépend du stade d'activation gliale, de la localisation et du niveau d'expression des cytokines et récepteurs associés par les cellules immunes et du SNC et de la balance pro- vs. anti-inflammatoire. En revanche, on ne sait pas réellement quelles cellules sont les **CPA du SNC** qui déclenchent cette réponse. Les macrophages périvasculaires, méningés et des plexus choroïdes sont capables de présenter des antigènes mais ne reviennent probablement pas dans les ganglions lymphatiques périphériques tout comme les cellules microgliales résidentes. Des cellules dendritiques systémiques infiltrant également le SNC et jouent leur rôle de CPA classiques. Une autre hypothèse est de considérer le SNC comme un **organe lymphoïde tertiaire** car des LT naïfs y sont directement activés (Tompkins *et al.* 2002). En effet, des structures similaires à des ganglions s'organisent à proximité des sites pathologiques comme les follicules B méningés décrit précédemment dans la SEP.

Aujourd'hui, le **suivi de la neuro-inflammation** est utilisé dans les pathologies du SNC incluant des pathologies infectieuses, auto-immunes ou neuro-dégénératives tant pour le diagnostic que pour le suivi des patients. Le LCR, notre seule fenêtre biologique sur le SNC du vivant du patient, est considéré comme le miroir de la neuro-inflammation, reflet de ce qui se passe au sein du SNC comme nous l'avons vu dans la SEP. En IRM, l'injection de gadolinium, un agent de contraste ne traversant pas la BHE intacte, permet de visualiser les altérations physiques de cette barrière au sein des plaques actives. On parle de rehaussement des lésions par le gadolinium. De façon plus fine, il est aujourd'hui possible de déterminer le caractère inflammatoire d'une lésion à un stade précoce de son développement en l'absence de rupture de la BHE. Par exemple, les particules USPIO (Ultra small super paramagnetic iron oxide particle) visualisent, par IRM, des macrophages infiltrant des lésions considérées comme inactives du fait de l'absence de rehaussement par le gadolinium (Vellinga *et al.* 2008).

a. La SEP est-elle une maladie auto-immune ?

L'auto-immunité, qu'est-ce que c'est ?

La SEP est considérée depuis longtemps comme une maladie **auto-immune organe-spécifique**, par opposition aux maladies auto-immunes systémiques. En effet, le SI ne semble s'attaquer qu'au SNC, ce qui paraît paradoxal connaissant le statut immunitaire spécialisé du SNC. Jusqu'alors, il était admis que les antigènes du SNC restaient confinés au SNC et n'étaient en quelque sorte pas perçus par le SI. Depuis, des antigènes du SNC ont été identifiés en périphérie. Il est donc possible que des LT auto-réactifs reconnaissant des antigènes du SNC soient activés en

périphérie avant d'infiltrer le SNC. Différents mécanismes conduisant à une telle rupture de tolérance vis-à-vis d'antigènes du « soi » ont été proposés (Fig. 16 et 19).

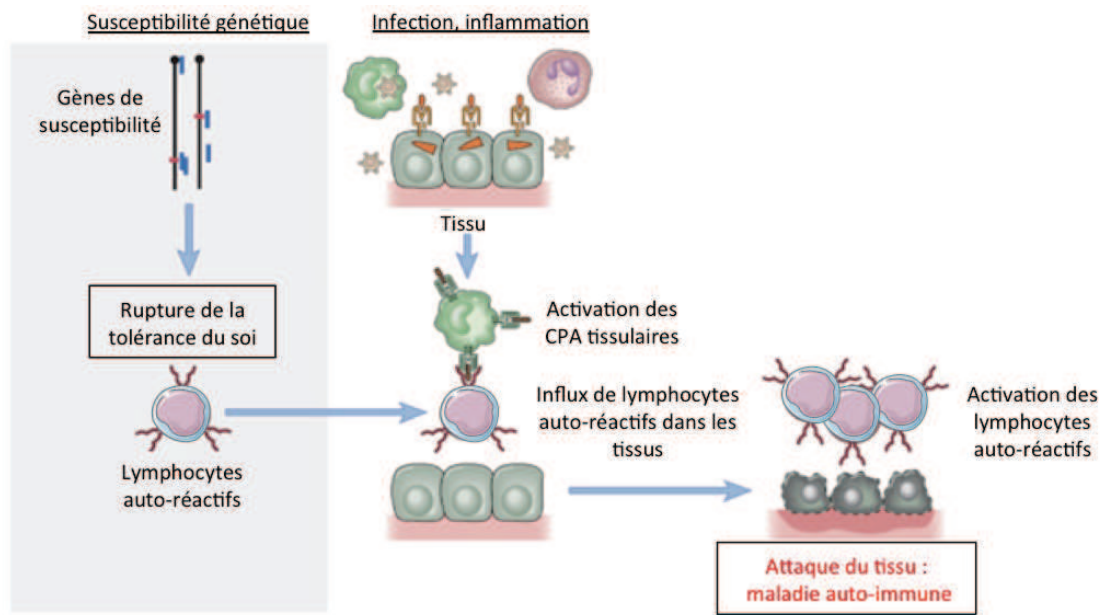


Figure 16 : Auto-immunité et rupture de tolérance (figure adaptée de Abbas *et al.* 2012).

L'encéphalite allergique expérimentale (EAE), un modèle de la SEP

Dans le contexte de l'hypothèse auto-immune de la SEP, l'EAE est considérée comme le **principal modèle animal** bien qu'il ne représente qu'une partie des mécanismes impliqués dans la SEP. En 1933, **Rivers** découvrait que l'immunisation de singes avec des extraits de cerveau de lapin provoquait des encéphalomyélites associées à de la démyélinisation et des infiltrats de leucocytes dans le SNC (Baxter 2007). Le principe de ce modèle repose sur l'induction d'une **réponse auto-immune** dirigée contre les composants de la myéline. L'attention s'est portée sur les antigènes de la myéline dès qu'il a été observé que l'induction de l'EAE était en réalité inefficace si l'on immunisait les animaux avec des cerveaux de lapin fœtaux, le processus de myélinisation n'ayant pas encore eu lieu. L'EAE a ensuite été transposée chez les rongeurs : l'injection d'un peptide de myéline chez le rat ou la souris provoque une paralysie progressive de l'animal (Fig. 17A). Toutefois, la plupart des protéines étant peu immunogènes en soi, des adjuvants sont additionnés à la préparation myélinique afin d'induire un contexte inflammatoire et de faciliter la rupture de tolérance en perturbant la réponse immunitaire. L'**adjuvant complet de Freund** est utilisé par exemple. Il s'agit de mycobactéries mortes qui contribuent d'une part au délai de relargage de l'antigène et d'autre part stimulent la présentation antigénique par les macrophages et l'expression des molécules de costimulation. Il est souvent injecté avec de la **toxine pertussique**.

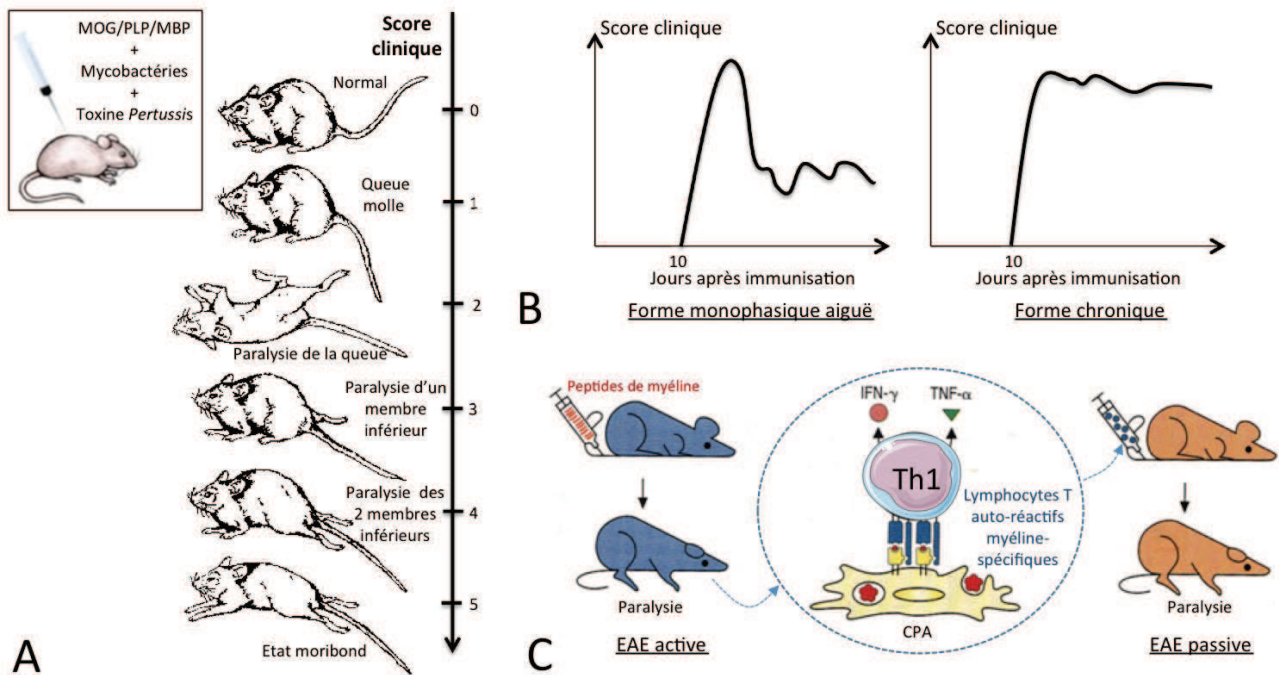


Figure 17 : Le modèle EAE de la SEP. A. L'immunisation active par des peptides de myéline associés à des adjuvants responsables d'une inflammation périphérique conduit à une perte de poids et une paralysie progressive des souris mesurée sur une échelle de scores cliniques. B. Exemples de formes cliniques de l'EAE. C. L'immunisation passive des souris par transfert de LT auto-réactifs conduit également à la paralysie des souris.

Les animaux EAE développent des lésions focales de démyélinisation. Des modèles aigus ou chroniques permettent de mimer différentes phases de la SEP (Fig. 17B). L'**EAE active**, comme décrite ci-dessus, a conduit à considérer la myéline, et plus précisément des peptides de MOG, MBP ou PLP, comme antigènes cibles au cours de la SEP. La démonstration d'une **EAE passive**, se développant suite au transfert des LT d'un animal EAE à un animal naïf, est à l'origine de l'hypothèse des LT auto-réactifs dirigés contre la myéline comme cause principale de la SEP (Fig. 17C). Très vite, les recherches ont montré qu'il ne s'agissait que de la partie émergée de l'iceberg de la SEP.

Qu'en est-il de la SEP ?

Si la SEP est toujours considérée comme une maladie auto-immune, c'est que de nombreux arguments appuient cette hypothèse. Tout d'abord, le gène de susceptibilité majeur de la SEP est l'un des gènes codant pour les molécules du CMH de classe II, **HLA-DR**, présentant les antigènes aux LT. Le facteur de risque conféré par l'allèle **HLA-DRB1** suggère que les LT des patients porteurs de cet allèle reconnaissent avec une plus grande affinité un auto-antigène cible présenté par cette molécule de CMH. Des modalités particulières de présentation antigénique via cette protéine pourraient favoriser une rupture de la tolérance immunitaire, et expliquer pourquoi ce gène est impliqué dans plusieurs maladies dysimmunitaires ou auto-immunes (Ramagopalan *et al.* 2009;

Patsopoulos *et al.* 2013). D'autres gènes de susceptibilité de la SEP sont aussi des gènes de l'immunité comme on le détaillera par la suite.

Les arguments neuropathologiques sont de poids et démontrent de façon certaine la **composante inflammatoire** de la maladie. En effet, la présence de macrophages ayant phagocyté des débris myéliniques, observée par Dawson dès le début du XX^{ème} siècle, et celles des infiltrats périvasculaires ont conduit Rindfleisch à proposer l'hypothèse de la théorie vasculaire selon laquelle les lésions se développent autour des capillaires sanguins. Par la suite, des altérations de la BHE ont été décrites mais les mécanismes d'entrée (et de sortie) des cellules immunes dans le SNC restent mal compris (Schmidt *et al.* 2012). De même, l'**efficacité des traitements anti-inflammatoires** et immuno-modulateurs, allant de la cortisone pour le traitement des poussées aux interférons comme traitement de fond, n'est guère contestée, du moins lorsque l'on considère les critères de nombre et de gravité des poussées. Pour le modèle EAE, il est également nécessaire d'induire une réponse inflammatoire périphérique par l'ajout de la toxine pertussique. Cette toxine, en activant des récepteurs de l'immunité innée, comme le récepteur Toll-like 4 (TLR4) et en déplaçant les LT régulateurs, soutient le dérèglement du contrôle du SI (Kerfoot *et al.* 2004; Chen *et al.* 2006). Sa dose croissante augmente l'atteinte myélinique.

Enfin, viennent les arguments d'auto-immunité proprement dite. Le modèle EAE a apporté la preuve de l'implication des **LT CD4⁺ auto-réactifs** dans la SEP, faisant ainsi progresser des années de recherche (Fig. 17C). L'immunisation par des peptides MOG ou MBP en périphérie précède l'entrée de LT helper 1 (Th1) antigène-spécifique dans le cerveau. On sait que des antigènes du cerveau circulent en périphérie et pourraient être à l'origine de la réponse auto-immune. L'EAE passive, par transfert des LT activés, a montré le pouvoir pathogène des LT CD4⁺ auto-réactifs. La présence d'auto-anticorps est aussi un argument décisif. Si des bandes oligoclonales sont observées dans le LCR de nombreux patients, il est difficile d'identifier la cible de ces anticorps. C'est sans doute parce que la NMO, longtemps considérée comme un sous-type de la SEP, est aujourd'hui diagnostiquée par la présence dans le sérum d'**auto-anticorps** dirigée contre l'aquaporine 4 (AQP4), exprimée par les astrocytes, que l'on continue de rechercher activement la présence d'auto-anticorps chez les patients SEP (Lucchinetti *et al.* 2002; Lennon *et al.* 2004). En effet, dans le cadre de la NMO, ces anticorps sont non seulement des outils diagnostiques mais aussi des acteurs physiopathologiques majeurs (Marignier *et al.* 2010). Dans la SEP, des anticorps dirigés contre la MBP (Owens *et al.* 2009) et plus récemment contre Kir-4, un canal potassique exprimé par les astrocytes (Srivastava *et al.* 2012), ont été identifiés.

L'hypothèse de l'auto-immunité permet de proposer un modèle cohérent mais non sans limite. En effet, les traitements anti-inflammatoires sont actuellement sans effet sur la phase progressive et la progression globale du handicap des patients SEP. Cette observation suggère

l'intervention d'autres facteurs situés en amont de l'auto-immunité, tel qu'un agent infectieux, ou en aval de l'auto-immunité, comme des processus neuro-dégénératifs évoluant pour leur propre compte. De même, le modèle de l'EAE présente ses limites (Steinman & Zamvil 2005). En établissant l'hypothèse de l'auto-immunité comme un présupposé, il restreint la mise en évidence d'autres mécanismes possibles. L'EAE a essentiellement permis de mettre en évidence le rôle des LT CD4⁺ qui, en franchissant la BHE et en produisant *in situ* des cytokines pro-inflammatoires, ont une action myéline-toxique directe ou indirecte via l'activation des cellules gliales, produisant à leur tour des cytokines et des radicaux libres. En revanche, la majorité des modèles d'EAE apportent peu d'informations sur le rôle potentiel des LT CD8⁺ et des lymphocytes B. Dans ce contexte, il est important de noter que, chez les patients SEP, la déplétion des LT CD4⁺ ne s'est pas montrée efficace (Friese & Fugger 2009; Salou *et al.* 2013). Toutefois, l'EAE, qui a permis d'identifier des cibles thérapeutiques potentielles, a donné le jour à de nombreux traitements et peut donc rester un modèle utile pour étudier certains aspects de la neuro-inflammation s'il est utilisé avec précaution.

b. La SEP est-elle une maladie virale ?

L'hypothèse infectieuse

Comme nous l'avons vu dans l'historique de la SEP, Pierre Marie, un des élèves de Charcot, défendait l'hypothèse selon laquelle la SEP était une manifestation tardive d'une infection de la petite enfance. La nécessité d'injecter de la toxine pertussique pour déclencher l'EAE soutient également le rôle d'un **agent extérieur**, viral ou bactérien, qui pourrait favoriser le déclenchement de la SEP. Nous verrons ici l'exemple de quelques **virus** parmi les nombreux qui ont été associés à la maladie. Cette question reste aujourd'hui très controversée. La présence de différents virus ou d'anticorps dirigés contre un ou plusieurs de ces virus a été fréquemment détectée chez les patients SEP. Mais, ces observations pourraient être uniquement une conséquence de l'immunodéficience induite par les traitements ou un reflet d'une dérégulation du SI liée à la physiopathologie de la maladie. En effet, on ne connaît pas le rôle joué par les altérations immunitaires, parfois secondaires au traitement, dans l'émergence ou la réémergence de ces virus et/ou de la réponse anticorps dirigés contre ces virus. L'ensemble de ces remarques peut s'appliquer aux différents virus incriminés dans la SEP, comme le virus d'Epstein-Barr (EBV), le virus humain herpès 6 (HHV-6), le virus de la rougeole, les coronavirus ou les séquences rétrovirales endogènes.

Les rétrovirus endogènes : Il s'agit de **séquences rétrovirales** insérées dans le génome de l'hôte depuis des millions d'années. Accumulées au cours de l'évolution, elles représentent 8% du génome humain. Ainsi, les protéines d'enveloppe d'anciens virus, par exemple, actuellement intégrées au génome humain, peuvent exercer une fonction dans l'organisme. Ces séquences restent

le plus souvent silencieuses et peuvent être ré-exprimées dans certaines pathologies comme la SEP. On retrouve, en effet, des ARN rétroviraux dans le LCR des patients (Mameli *et al.* 2007; Perron *et al.* 2012). Des modifications épigénétiques, modifiant l'état de la chromatine, modifieraient l'expression de ces séquences rétrovirales. Cependant, aucun lien de causalité n'a réellement été démontré.

Le virus HHV-6 : Ce virus infecte les LT CD4⁺ via le récepteur membranaire CD46. Des cas d'encéphalites associées à des démyélinisations multifocales ont été rapportés chez des patients immunodéprimés. *In vitro*, les oligodendrocytes sont directement sensibles à HHV-6. L'ADN du virus est retrouvé dans le SNC, le LCR et le sang de 70% des patients SEP mais aussi de témoins (Challoner *et al.* 1995). En revanche, les antigènes viraux ont été détectés par immuno-marquage uniquement chez les patients, en particulier à proximité des lésions. Les résultats restent toujours controversés. De plus, la protéine virale U24 compte sept acides aminés en commun avec la protéine de myéline MBP, ce qui a conduit à l'hypothèse du mimétisme moléculaire. Des LT CD4⁺ cross-réactifs contre les deux antigènes seraient responsables de l'activation de la réponse immunitaire. Néanmoins, même si la réponse immunitaire mise en place contre le virus semble se retourner contre la myéline, la similitude de séquences de la protéine virale et la protéine de myéline ne serait pas suffisante pour expliquer une rupture de tolérance. L'effet perturbateur du virus sur la réponse immunitaire est davantage suspecté (Michiels & Brahic 2012).

Le virus d'Epstein-Barr (EBV) : Quatre-vingt-dix pourcents de la population saine est infectée par EBV. Chez les patients SEP, ce pourcentage atteint 99%. Il s'agit d'un virus le plus souvent asymptomatique ou qui provoque des mononucléoses infectieuses. Les sujets qui ont développé une telle mononucléose ont deux fois plus de risque de développer la SEP. De plus, EBV présente un tropisme particulier pour les **lymphocytes B** (LB) qu'il immortalise, déclenchant parfois des lymphomes B (Rochford *et al.* 2005). Le taux d'anticorps anti-EBV est élevé dans les sérums SEP et d'autres maladies auto-immunitaires comme le lupus érythémateux. Enfin, il est intéressant de noter que l'association récente des follicules lymphoïdes des méninges avec les lésions corticales de la SEP pourrait aussi être liée au réveil d'EBV dans le SNC puisque certains de ses gènes sont exprimés au sein de ces follicules (Serafini *et al.* 2007; Magliozzi *et al.* 2013). Par exemple, l'expression d'une seule molécule virale pourrait mimer l'activation des LB.

La démyélinisation induite par le virus de Theiler, un autre modèle de la SEP

Un autre modèle animal de la SEP repose sur l'injection du **virus de Theiler**. Certaines souches de souris sont capables d'éliminer complètement le virus alors que l'infection persiste dans

d'autres souches. Chez ces souris, suite à la réponse immunitaire mise en place contre le virus, des **lésions de démyélinisation** apparaissent tardivement, après un temps de latence du virus (Fig. 18). Ce modèle fournit l'exemple d'une réponse immunitaire dirigée initialement contre un virus, qui peut se retourner contre l'hôte et provoquer une réponse auto-immune. En effet, les souris infectées expriment d'abord des anticorps dirigés contre le virus puis contre la myéline (Sospedra & Martin 2005).

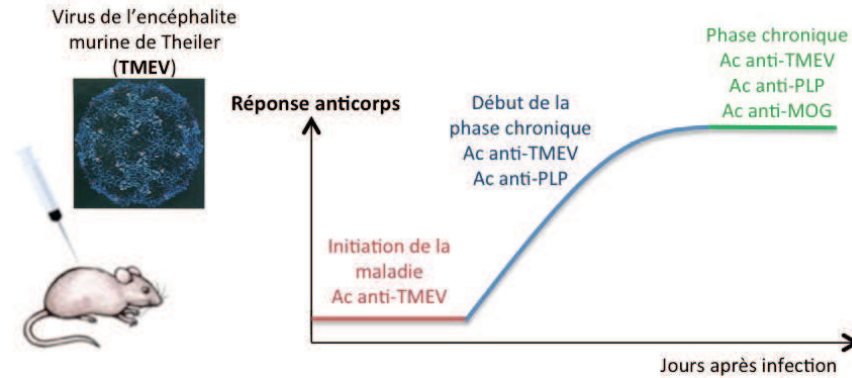


Figure 18 : Démyélinisation induite par le virus de Theiler (figure adaptée de Sospedra & Martin 2005). Suite à l'infection par le virus de Theiler, les souris développent des lésions de démyélinisation, des anticorps dirigés contre le virus (Ac anti-TMEV) puis des anticorps dirigés contre la myéline (Ac anti-PLP et anti-MOG).

De la réponse anti-virale à la réponse auto-immune ?

Plusieurs mécanismes pourraient expliquer le passage d'une réponse immunitaire dirigée contre un virus ou un autre pathogène à une réponse auto-immune dirigée contre le soi, en l'occurrence des antigènes de myéline (Fig. 19) (Michiels & Brahic 2012) :

- **Le mimétisme moléculaire** : La ressemblance des déterminants antigéniques du virus avec des protéines du soi entraînerait une réponse croisée accidentellement dirigée contre l'hôte (Oldstone 1998) (Fig. 19A). Cette hypothèse, longtemps acceptée, est aujourd'hui contestée.
- **L'activation des cellules T bivalentes** : Il existe des LT CD8⁺ qui expriment deux récepteurs T (TCR) fonctionnels de spécificité différente (Fig. 19B). Les deux récepteurs ont une de leurs deux chaînes en commun (α ou β), ce qui est théoriquement impossible d'après le principe d'exclusion allélique. Un virus activerait un TCR, activant le second au passage, dirigé par exemple contre la myéline (Ji *et al.* 2010).
- **L'amplification antigénique ou « epitope spreading »** : La réponse immunitaire mise en place contre un virus peut conduire à la présentation anormale d'autres antigènes (démasquage antigénique), par exemple suite à la destruction de cellules infectées, modifiant ainsi la cible de la réponse (Fig. 19C) (McMahon *et al.* 2005). Ce pourrait être le cas du virus de Theiler. Des anticorps dirigés contre différents épitopes de la protéine de myéline PLP, puis MOG, sont identifiés dans ce modèle. Les processus auto-immuns s'amplifient alors.

- **Les effets collatéraux ou « bystander »** : Ils sont dus à la toxicité que peut exercer la réponse immunitaire dirigée contre le virus pour les cellules voisines (Fig. 19D). Par exemple, le TNF- α , sécrété par les LT et les macrophages, s'avère, à forte dose, toxique pour les neurones et les oligodendrocytes localisés à proximité des cellules infectées. Les dommages occasionnés amplifient eux-mêmes l'inflammation.

Ainsi, on comprend que des virus puissent jouer un rôle soit déclencheur, soit modulateur de la SEP. Dans ce scénario, l'agent infectieux disparaîtrait souvent avant la survenue des symptômes, d'où la difficulté de l'associer à une pathologie.

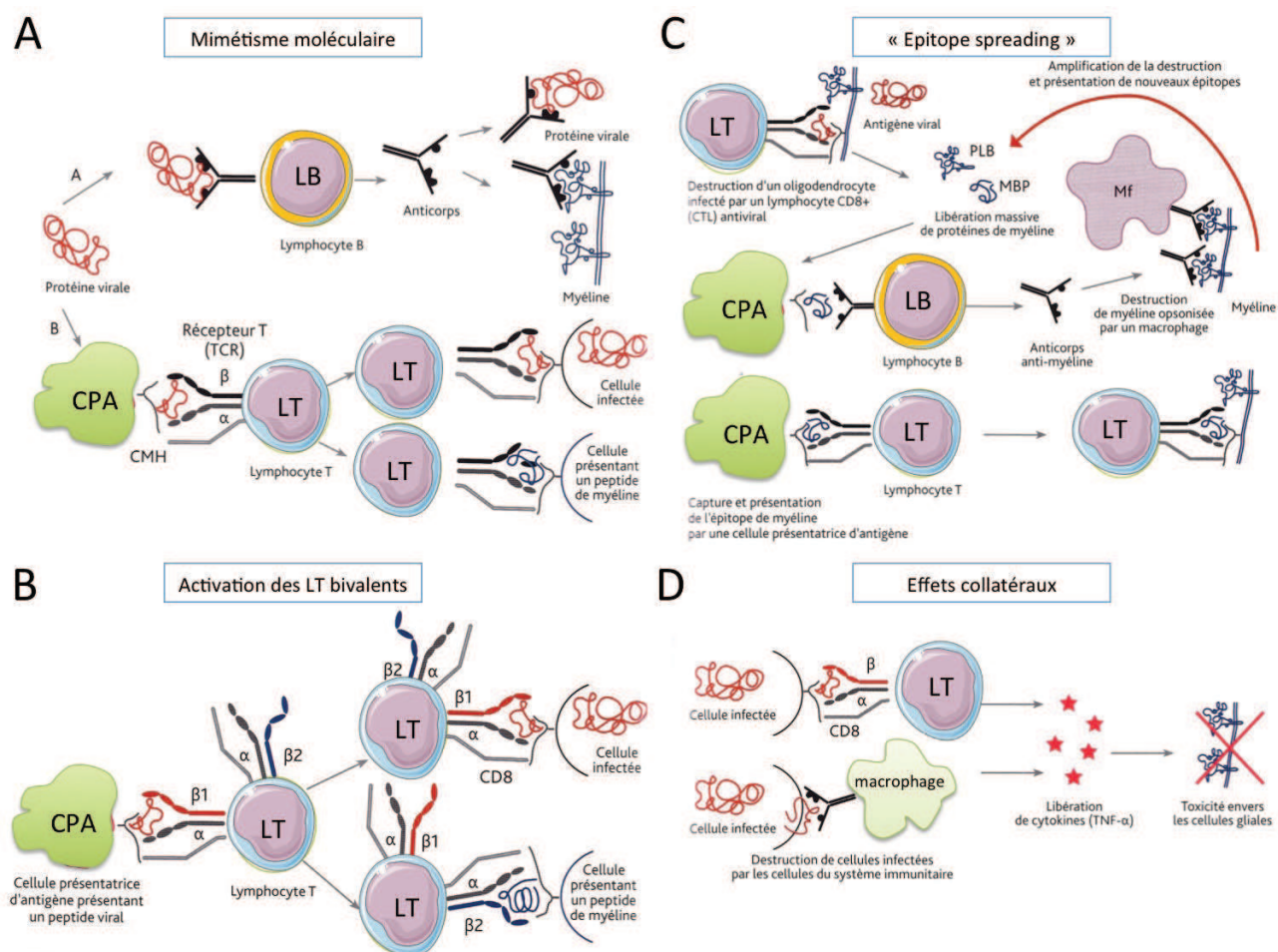


Figure 19 : Les mécanismes de passage d'une réponse anti-virale à auto-immunitaire (figure adaptée de Michiels & Brahic 2012). **A**. Le mimétisme moléculaire. **B**. L'activation des cellules T bivalentes. **C**. L'« epitope spreading ». **D**. Les effets collatéraux.

c. La SEP est-elle une maladie génétique ?

La SEP n'est pas une maladie héréditaire à proprement parler. La majorité des cas de SEP sont **sporadiques**. Cependant, 5 à 10% des cas relèvent de **formes familiales**. Au sein de ces familles, le risque de développer la SEP varie selon le degré de parenté avec les individus atteints. Même chez les vrais jumeaux, les études de concordance ne mettent en évidence que 30% de risque (Willer *et al.* 2003; Compston & Coles 2008). De nombreux gènes de susceptibilité ont été

découverts. La première découverte, celle de la molécule de présentation antigénique CMH HLA-II, date de 1972. L'allèle **HLA-DRB1** est le plus fortement impliqué (Hafler *et al.* 2007; Ramagopalan *et al.* 2009). L'association d'un gène du CMH-II au risque de développer la SEP soutient l'hypothèse auto-immune ou, en tout cas, un rôle majeur du SI. Néanmoins, la région génétique du CMH est en étroite association avec d'autres gènes qui pourraient également expliquer une réponse inflammatoire dérégulée (Patsopoulos *et al.* 2013). En ce sens, les études « Genome Wide Association Study » (GWAS) des années 2000 et les études du consortium international de génétique de la SEP (IMSGC) ont mis en évidence de nombreux gènes immunitaires renforçant l'hypothèse d'un dérèglement de l'immunité (Hafler *et al.* 2007; Kreymborg *et al.* 2007; Habek *et al.* 2010; IMSGC 2010; Oksenberg & Baranzini 2010; Depaz *et al.* 2011; Gourraud *et al.* 2012). Il s'agit de gènes codant pour des cytokines, des récepteurs de cytokines, des molécules d'adhésion et des molécules de signalisation des cellules immunitaires (Table 2).

Table 2 : Les gènes de susceptibilité immunitaires de la SEP.

Gène	Fonction
CD58	Protéine d'adhésion LFA-3, costimulateur immunitaire
CD226	Protéine d'adhésion
CD40	Récepteur de costimulation immunitaire
CD6	Protéine d'adhésion
CDK2AP1	Inhibiteur de kinases cycline-dépendentes
CLEC16A	Inconnue
EVI5	Activateur de GTPases, signalisation cytokinique
IL12A	Cytokine IL-12
IL2RA	Récepteur de la cytokine IL-2
IL7R	Récepteur de la cytokine IL-7
IL22RA2	Récepteur de la cytokine IL-22
IRF8	Facteur de transcription de la voie interféron
RGS1	Activateur de GTPases, signalisation de chimiokine
TNFRSF1A	Récepteur de la famille des récepteurs au TNF
TYK2	Tyrosine kinase associée aux récepteurs de cytokines
VAV1	Protéine de signalisation immunitaire

d. Des facteurs environnementaux mis en cause

Le premier argument qui a fait suspecter un agent causal exogène à l'origine de la SEP est la **distribution géographique hétérogène** de son incidence. La prévalence de la SEP est, en effet, plus élevée dans les régions tempérées que dans les régions tropicales (Fig. 20A). Un gradient Nord/Sud est observable, entre autres, à l'échelle de l'Europe et de nombreux pays européens. D'après les études des mouvements migratoires, le risque de développer la maladie s'est avéré lié aux quinze premières années de vie (Ebers 2008; Compston & Coles 2008). De plus, il existe des foyers de SEP ayant fait penser à des foyers épidémiques, notamment au sein des îles Féroé, un archipel situé entre l'Islande et l'Ecosse. Cette distribution suggère une **influence du climat**, de l'**exposition au soleil**, ou même du **mode de vie**. La faible concordance entre les jumeaux confirme bien une l'influence de l'environnement.

La littérature la plus importante s'intéresse à la **vitamine D**. En France, on retrouve l'idée d'un gradient Nord/Sud de la SEP, suggérée par une plus forte incidence dans les départements du Nord (Fig. 20B) (Vukusic *et al.* 2007). Cette dernière est parfaitement corrélée au niveau d'exposition aux rayons ultra-violet et donc étroitement liée à l'apport en vitamine D (Handel *et al.* 2010; Pierrot-Deseilligny & Souberbielle 2010). De la même façon, il existe une relation entre la maladie et le mois de naissance : davantage de patients sont nés au mois de mai, moins au mois de novembre. Ceci est inversement corrélé à la concentration sérique en vitamine D de la population générale suggérant un rôle protecteur de la vitamine D (Fig. 20C). Il est intéressant de noter que la séquence du gène codant pour le récepteur de la vitamine D est comprise dans l'allèle HLA-DRB1. Si le rôle de la vitamine D est mieux connu dans la physiologie calcique, elle possède aussi des effets sur la réponse immunitaire (Fig. 20D). Elle prévient le développement de l'EAE, de façon plus marquée chez les souris femelles, en inhibant la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et en favorisant la réponse des LT régulateurs (VanAmerongen *et al.* 2004; Lysandropoulos *et al.* 2011). L'apport de vitamine D chez les patients SEP donne des résultats encourageant avec une réduction des poussées de 30% (Munger *et al.* 2004; Pierrot-Deseilligny & Souberbielle 2010).

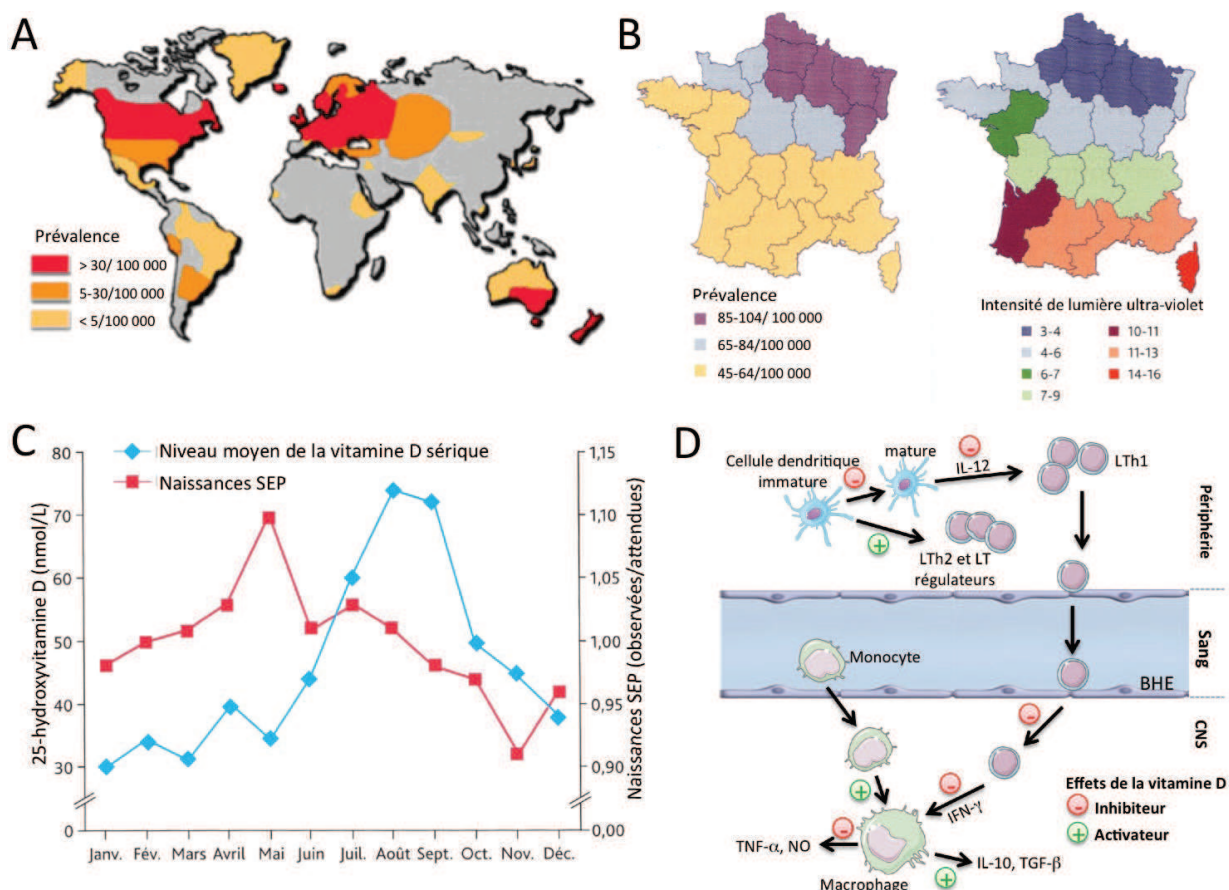


Figure 20 : Facteurs environnementaux et SEP. **A.** Répartition géographique de la prévalence mondiale (extraite de Compston & Coles 2008). **B.** Forte corrélation entre la prévalence de la maladie et la latitude du lieu d'habitation en France (cartes extraites de Moreau *et al.* 2012). **C.** Corrélation négative entre la concentration sérique de vitamine D dans la population générale et la courbe des mois de naissance des personnes atteintes de la SEP (extrait de Handel *et al.* 2010). **D.** Effets potentiels de la vitamine D montrés dans le modèle murin EAE (adapté de VanAmerongen *et al.* 2004).

Toutefois, d'autres facteurs sont aussi étudiés. Citons par exemple l'**effet du tabac**, de l'**alcool** ou de l'**urbanisation**. Le risque de développer la SEP semble plus élevé chez les fumeurs, la deuxième poussée survenant plus rapidement chez les fumeurs par rapport aux non-fumeurs (Hedström *et al.* 2011). Est-ce que la nicotine altérerait la BHE et stimulerait la production d'oxyde nitrique à des niveaux toxiques ? Les mécanismes sont encore mal compris. Enfin, on ne sait toujours pas pourquoi certaines personnes développent une première poussée à l'issue d'un choc émotionnel important comme la perte d'un proche ou autre accident de la vie.

e. La SEP est-elle une maladie neuro-dégénérative ?

Une hypothèse initialement à contre courant vient peu à peu s'imposer pour expliquer certaines composantes de la SEP. En effet, plusieurs arguments suggèrent que des **mécanismes neuro-dégénératifs, indépendants ou non de l'inflammation**, se produisent dans la SEP. Des études IRM ont montré que des changements tissulaires se développent au sein de la SB avant même l'apparition d'une lésion IRM classique rehaussée au Gadolinium (Filippi *et al.* 1998). Ces événements pourraient être de nature dégénérative et précéder l'infiltration inflammatoire. Soutenant cette hypothèse, l'**atrophie cérébrale** augmente continuellement au cours de la maladie et les lésions inflammatoires classiques ne suffisent pas à l'expliquer (Fu *et al.* 1998; Pelletier *et al.* 2003). Au contraire, on l'attribue à l'**atteinte axonale diffuse** qui touche la SBAN et qui peut être observée sur des tissus *post-mortem* (Evangelou *et al.* 2000; Androdias *et al.* 2010) ou par des techniques d'IRM non conventionnelles (Rovaris *et al.* 2001b). Elle est associée à une augmentation du signal du ratio de transfert de magnétisation (MTR) (Fu *et al.* 1998) et à une réduction globale du taux d'aspartate N-acétyle (NAA) vue en spectroscopie à résonance magnétique (Losseff *et al.* 1996; Brück *et al.* 1997; Bjartmar *et al.* 2000; Pelletier *et al.* 2003). La perte axonale diffuse est aussi associée à la **dégénérescence Wallérienne**, secondaire à la démyélinisation focale, mais ce mécanisme ne suffit pas à expliquer l'atrophie cérébrale des patients présentant un faible nombre de lésions focalisées. Plusieurs études ont montré que la pathologie axonale se développait de façon indépendante de celle de la myéline (Lovas *et al.* 2000; Filippi *et al.* 2000, 2003; Bergers *et al.* 2002; Bot *et al.* 2004). Un autre argument en faveur d'un processus de neuro-dégénérescence est le fait que la perte axonale soit étroitement corrélée au handicap moteur des patients, et davantage que ne l'est la charge lésionnelle (De Stefano *et al.* 2001; Tallantyre *et al.* 2010). Enfin, quand on parle de perte axonale, il s'agit bien aussi de véritable **perte neuronale** au sein de la SG. La myéline ne représentant que 2% de la SG, la perte axonale ne suffirait pas à expliquer son atrophie. Des mécanismes autonomes de mort neuronale pourraient expliquer l'atrophie corticale (Calabrese *et al.* 2012, 2013). Nous détaillerons, par la suite, certains des mécanismes cellulaires à l'origine de la perte axonale et neuronale dans la SEP. On comprend

donc mieux pourquoi certains auteurs considèrent l'origine exclusivement dégénérative des formes progressives d'emblée et suggèrent que la réponse inflammatoire et auto-immune est secondaire à la neuro-dégénérescence (Stys *et al.* 2012). Néanmoins, cette hypothèse reste controversée et la plupart des auteurs refusent de dissocier complètement neuro-dégénérescence et inflammation (Lassmann 2007).

Que la SEP soit une véritable maladie auto-immune, neuro-dégénérative ou une maladie d'origine infectieuse, son étiologie demeure complexe. On parle de maladie plurifactorielle sans doute parce que la cause initiale reste inconnue. Quel que soit l'événement déclenchant, qui diffère possiblement d'un patient à l'autre, des mécanismes physiopathologiques communs semblent expliquer le développement des différentes altérations tissulaires qui caractérisent de la SEP.

2) Développement des lésions SEP : la balance neuro-inflammation/neuro-dégénérescence

a. L'inflammation, un moteur de la démyélinisation

Descriptions des lésions périvasculaires

Dawson et Rindfleisch ont été les premiers à observer des **infiltrats périvasculaires** et des macrophages phagocytant des débris myéliniques (Dawson 1916). C'était, nous l'avons dit, le début de l'hypothèse inflammatoire. La présence, presque systématique, d'un **vaisseau au centre d'une lésion SEP** conduisait à penser que l'afflux de cellules immunes dans le parenchyme cérébral était secondaire à une atteinte primitive des vaisseaux et à l'origine de la lésion (Fog 1965). Néanmoins, l'hypothèse vasculaire est actuellement remise en cause (Kozinska *et al.* 2004). En effet, les lésions présentant une prise de contraste en IRM restent finalement assez peu nombreuses dans les stades précoces de la maladie et presque absentes dans les formes premièrement progressives de la SEP, suggérant une préservation relative de la BHE (Bradl & Lassmann 2009).

Destruction des gaines de myéline par les macrophages et les cellules microgliales

L'**activation des cellules microgliales** est observée avant même la formation des lésions et avant l'infiltration par les lymphocytes et les macrophages périphériques. Grâce à la technologie bi-photonique, on peut aujourd'hui observer en temps réel, dans les modèles EAE de souris, l'action

des cellules microgliales et le recrutement rapide des macrophages et cellules dendritiques sur les sites lésionnels (Fenrich *et al.* 2012). L'inactivation pharmacologique ou l'ablation génétique des cellules microgliales induit une réduction des signes cliniques de l'EAE (Heppner *et al.* 2005; Sloka *et al.* 2013), ce qui, dans un sens, n'est pas étonnant étant donné l'ampleur des **propriétés cytotoxiques** des cellules microgliales activées. En effet, une fois activées, les cellules microgliales présentent de nombreuses similitudes phénotypiques et fonctionnelles avec les macrophages recrutés de la périphérie. Elles participent alors activement à la **phagocytose de la myéline** et au **maintien d'un environnement pro-inflammatoire**, en sécrétant notamment des cytokines du type IL-1 β , IL-6, IL-12, IL-23, IFN- γ et TNF- α (Cao & He 2013). Les cellules microgliales génèrent un large éventail de substances potentiellement toxiques contribuant à l'atteinte de la myéline et des axones. Celles-ci incluent les dérivés azotés (monoxyde d'azote NO), les dérivés oxygénés (ions super-oxydes O $^{2-}$), la glutamine et les cytokines IL-1 β , IFN- γ et TNF- α toxiques à forte dose (Fig. 15B). On pourrait penser intuitivement que ce sont les macrophages périvasculaires qui activent les cellules microgliales mais il a été récemment montré que les cellules microgliales elles-mêmes sont susceptibles d'altérer la BHE et d'induire le recrutement des macrophages de la périphérie (Davalos *et al.* 2012). Toutefois, cette vision d'un rôle globalement délétère des cellules myéloïdes dans la physiopathologie de la SEP est probablement trop simpliste au vu des données montrant leurs fonctions trophiques et de réparation tissulaire que nous détaillerons par la suite.

Des lymphocytes T qui perdent le contrôle

Les cellules T infiltrent les lésions actives de SEP et, dans une moindre mesure, la SBAN, la SGAN et le LCR. Le répertoire T 7 des lymphocytes infiltrant le SNC des patients SEP présente une **distribution oligoclonale**, signant une réponse spécifiquement dirigée contre un nombre restreint d'antigènes (Junker *et al.* 2007). On trouve notamment des **LT auto-réactifs dirigés contre des épitopes de myéline** dans le sang des patients, qui pourraient être différents de ceux retrouvés chez les sujets sains (Elong Ngono *et al.* 2012). De plus, le répertoire T dans le sang des patients SEP semble rapidement altéré au cours de la maladie (Laplaud *et al.* 2004, 2006).

Depuis longtemps et par analogie avec l'EAE, la maladie est considérée comme médiée par les **LT CD4 $^+$ helper 1** (Th1) (Traugott *et al.* 1983). D'ailleurs, le risque génétique associé au CMH II est bien lié à la présentation antigénique au LT CD4 $^+$. Le LCR et les lésions des patients contiennent des cytokines de type Th1 (IL-12, IFN- γ) (Fig. 13) et le traitement des patients par l'IFN- γ a aggravé la maladie (Panitch *et al.* 1987; Fletcher *et al.* 2010; Lovett-Racke *et al.* 2011).

⁷ Le répertoire T désigne l'ensemble des clones de LT d'un individu qui sont capables de reconnaître une grande diversité d'antigènes grâce à la diversité des récepteurs des LT (ou TCR). On parle aussi de répertoire des TCR.

Dans les modèles d'EAE passive, le transfert adoptif de Th1 induit l'EAE chez des animaux non immunisés, montrant leur rôle pathogène. Le rôle classique des Th1 est d'activer la réponse à médiation cellulaire via l'activation des macrophages et cellules microgliales. Un rôle directement cytotoxique des LT CD4⁺ a également été montré via le système perforine habituellement associé aux LT CD8⁺ (Sospedra & Martin 2005). Néanmoins, leur déplétion n'a pas montré d'effet bénéfique pour la maladie, suggérant l'implication d'autres populations lymphocytaires.

Dans les années 1990, la mise en évidence de taux élevé d'IL-17 et d'IL-23 dans les lésions SEP, en particulier les lésions actives, et dans le LCR des patients a conduit à impliquer une autre population de LT CD4⁺, les **LT CD4⁺ helper 17** (Th17), dans la physiopathologie de la SEP (Tzartos *et al.* 2008) (Fig. 13). Les Th17 sont abondants dans les infiltrats périvasculaires et sont présents dans les follicules B des méninges (Saresella *et al.* 2013). Retrouvés en plus grand nombre dans le sang, ils franchiraient aussi plus facilement la BHE (Lovett-Racke *et al.* 2011). Leur présence accrue dans le sang ou le LCR semble corrélée aux phases de poussée de la maladie (Lovett-Racke *et al.* 2011). Dans les modèles EAE, les Th17 interviennent avant même l'apparition des symptômes cliniques (Murphy *et al.* 2010) et sont capables d'induire l'EAE par transfert adoptif (Fletcher *et al.* 2010). Malheureusement, un essai clinique d'inhibition des Th17 s'est avéré inefficace (Segal *et al.* 2008). On ne sait pas réellement quel est le rôle des Th17 par rapport aux Th1. Les Th17 ne sont sans doute pas indispensables au développement de la maladie puisque l'EAE se développe normalement chez des souris déficientes en IL-17. Il existe également un phénotype intermédiaire de LT sécrétant à la fois l'IL-17 et l'IFN- γ qui montre la grande plasticité des LT en fonction du microenvironnement cytokinique.

Contrairement à l'EAE, les **LT CD8⁺** sont majoritaires dans les lésions SEP (Babbe *et al.* 2000; Cabarrocas *et al.* 2003). Le LCR des patients en est enrichi très précocement (Jilek *et al.* 2007). Leur action cytotoxique pourrait être très efficace contre la myéline et les oligodendrocytes, mais aussi contre les axones et les astrocytes, qui présentent, dans le contexte neuro-inflammatoire, les molécules du CMH de classe I. En effet, le transfert adoptif de LT CD8⁺ dirigés contre des peptides de myéline induit l'EAE chez des animaux et l'activité cytotoxique des LT CD8⁺ contre la myéline est augmentée chez les patients. D'autre part, il a été montré une forte corrélation entre l'atteinte axonale et la quantité de LT CD8⁺ infiltrant le SNC (Frieze & Fugger 2009), un lien direct de cause à effet ayant été montré *in vitro* (Neumann *et al.* 2002). On attribue donc un rôle essentiel aux LT CD8⁺ dans le développement de la maladie. Il est intéressant de noter qu'une population de LT CD8⁺ sécrète également l'IL-17 (Tzartos *et al.* 2008; Salou *et al.* 2013).

La présence de LT auto-réactifs chez les sujets sains témoigne de mécanismes contrôlant leur action délétère potentielle impliqués dans le développement ou non de la maladie. En effet, les **LT CD4⁺ helper 2** (Th2) et les **LT régulateurs** sont sensés contrebalancer les mécanismes pro-

inflammatoires cités ci-dessus (Fig. 13). Les Th2 n'ont pas montré de rôle pathogène dans la SEP et semble y activer un profil réparateur des macrophages et cellules microgliales. C'est pourquoi, les traitements immuno-modulateurs visent à favoriser la différenciation Th2. En revanche, l'importance des LT régulateurs dans la SEP est controversée car ils sont difficiles à isoler et présentent de nombreuses sous-populations (Viglietta *et al.* 2004; Pettré *et al.* 2009). Dans les modèles EAE, leur transfert adoptif permet de contrôler la sévérité de la maladie via une action suppressive sur les autres LT (Venken *et al.* 2010). Les LT régulateurs naturels CD25⁺ sont retrouvés dans le LCR de patients SEP mais sont très peu nombreux au sein des lésions, suggérant leur élimination précoce (Fritzsching *et al.* 2011). Dans le sang, ils sont quantitativement aussi nombreux que chez les sujets sains mais probablement non fonctionnels chez les patients (Venken *et al.* 2010). En effet, un défaut d'activation des LT régulateurs naturels ou induits pourraient expliquer le maintien de l'activation des Th1, Th17 et LT CD8⁺.

Il reste encore beaucoup de points à éclaircir pour comprendre l'action des LT dans la SEP. On ne peut expliquer pourquoi les LT sont absents de certaines lésions de démyélinisation précoces. On pourrait aussi s'interroger sur l'identité des auto-antigènes contre lesquels la réponse T est dirigée (Berer *et al.* 2011). Il est possible qu'il ne s'agisse pas uniquement de composants myéliniques mais aussi d'antigènes dérivant du corps oligodendrocytaire, des astrocytes et des neurones. Enfin, il reste à comprendre comment et pourquoi des LT auto-réactifs sont activés en périphérie ou réactivés dans le SNC, et comment ils franchissent la BHE (Salou *et al.* 2013). Les mécanismes de rupture de tolérance présentés dans la figure 19 expliqueraient les processus conduisant à une réponse auto-immune antigènes-spécifiques. Déterminer pourquoi ils se déroulent chez les patients SEP est un défi important.

Le rôle non négligeable des lymphocytes B

Le rôle des **LB** a déjà été évoqué de longue date (Prineas & Graham 1981), mais il est réellement considéré depuis peu. Pourtant, la présence de LB, de LB mémoires, de plasmocytes, de plasmablastes et d'anticorps est incontestable dans le LCR et le SNC des patients (Barnett *et al.* 2009a; Meier *et al.* 2012). Leur présence suggère l'implication de l'immunité humorale, qui est confirmée par la présence de bandes oligoclonales dans le LCR de la plupart des patients. De plus, la déplétion des LB par le **Rituximab**, un anticorps thérapeutique dirigé contre la molécule CD20 exprimée à la surface des LB, s'est avérée efficace dans les formes rémittentes (Hauser *et al.* 2008; Bar-Or *et al.* 2008). Le sérum des patients contient des **auto-anticorps** dirigés contre des protéines de la myéline ou encore contre le canal potassique Kir-4, exprimé par les astrocytes (Sospedra and Martin, 2005; Srivastava et al., 2012 Owens et al., 2009). Sont-ils de simples biomarqueurs ou présentent-ils une activité pathogénique ? Chez l'animal, le transfert d'auto-anticorps ne suffit pas à

induire l'EAE suggérant leur implication dans l'aggravation, plutôt que dans l'initiation, des lésions. La question de la diversité des antigènes reconnus est la même que pour les LT (Fig. 19).

La présence de **follicules B** dans les méninges de 50% des patients atteints de formes secondairement progressives semble être corrélée à l'atteinte corticale et à la gravité de la maladie (Fig. 10D) (Magliozzi *et al.* 2007). Ces structures lymphoïdes tertiaires constituent un environnement propice à la production d'anticorps et seraient des sites de réactivation de virus latents comme EBV (Serafini *et al.* 2007). Au-delà de la production d'anticorps, les LB joueraient d'autres fonctions dans la physiopathologie de la SEP. Une étude a montré, chez l'animal, la capacité de **présentation antigénique** des LB aux LT (Pierson *et al.* 2014). Une autre a montré que des LB mémoires de patients pouvaient activer des LT CD4⁺ (Harp *et al.* 2010). Cette activation des LT pourrait avoir lieu au sein des follicules B sans passage nécessaire dans les ganglions lymphatiques. Les LB modulent aussi la réponse et le recrutement des LT via la production de cytokines et chimiokines. Enfin, il existe des **LB régulateurs** dont l'action, comme les LT régulateurs, est médiée par l'IL-10. Toutefois, cette population reste encore mal connue.

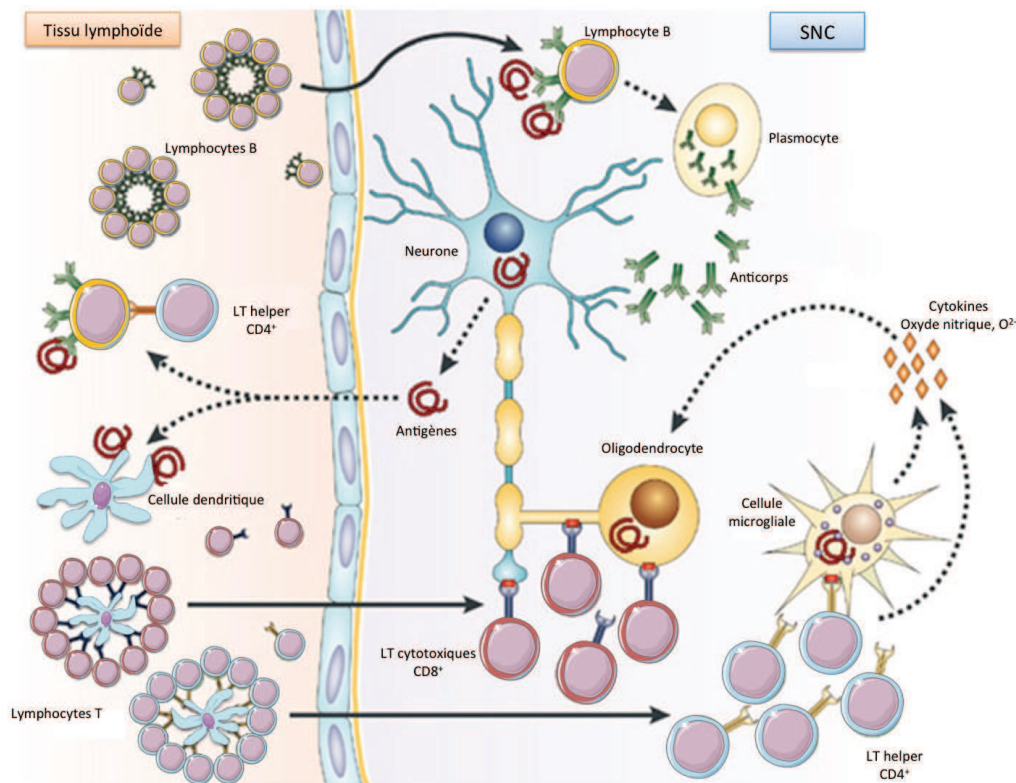


Figure 21 : Inflammation et démyélinisation dans la SEP (figure adaptée de Hemmer *et al.* 2002).

Des stratégies thérapeutiques prometteuses ?

Les mécanismes inflammatoires décrits précédemment sont les premières cibles des stratégies thérapeutiques actuelles (Fig. 21). Il s'agit de supprimer un type cellulaire destructeur ou de moduler la réponse immunitaire en induisant des profils cellulaires protecteur, de type Th2 pour les lymphocytes ou réparateur pour les cellules myéloïdes. Certaines stratégies ciblent un type

cellulaire particulier ou ont des effets plus larges, présentant de plus grandes répercussions sur le fonctionnement général du SI. Ces dernières sont donc plus risquées.

Les traitements utilisés actuellement ciblent avant tout les **poussées**. Les poussées sont traitées par des pulses de **corticoïdes** à forte dose sur une courte période. La seule efficacité démontrée est la réduction de la durée de la poussée, sans bénéfice sur les séquelles éventuelles. Dans les poussées peu sévères, une abstention thérapeutique peut donc être proposée. Les corticoïdes réduisent la réponse inflammatoire en inhibant la prolifération des LT CD4⁺, des monocytes et des éosinophiles, la synthèse des prostaglandines et des leucotriènes, et l'expression de CMH II par les macrophages et cellules microgliales (Fischer *et al.* 2013a).

Des **traitements de fond** sont également disponibles afin de limiter la survenue des poussées cliniques et le nombre de lésions IRM rehaussées au Gadolinium (Hemmer & Hartung 2007). Parmi eux, les **Interférons β** diminuent l'expression des CMH II et des molécules de costimulation par les CPA, et diminueraient donc l'activation des LT. Une réduction du profil Th1 au profit d'une augmentation du profil Th2, une diminution des molécules d'adhésion et un plus faible passage dans le SNC ont également été observés. L'**Acétate de glatiramer** est, lui, moins connu dans son mode d'action. Il pourrait favoriser le profil cytokinique de type Th2 et agirait sur les LT et LB régulateurs. Parmi les autres immuno-suppresseurs utilisés, la **Mitoxantrone**, un intercalant de l'ADN, réduit la prolifération des lymphocytes et a donc des effets sur l'immunité cellulaire et humorale. Ces traitements sont prescrits dans les formes rémittentes mais très peu d'efficacité a été démontrée dans les formes progressives. Enfin, des **traitements symptomatiques** sont bien sûr indiqués contre la spasticité, les douleurs, les paresthésies, les troubles génito-sphinctériens et la fatigue. La prise en charge des patients demande la mise en place de mesures médico-sociales incluant la kinésithérapie et les appareillages.

Certains patients ont connu l'évolution de la recherche, depuis le traitement des poussées par la cortisone à haute dose dans les années 80, les traitements Interférons et l'Acétate de glatiramer dix ans plus tard, au premier anticorps monoclonal, le Natalizumab, en 2007. Le **Natalizumab** est un anticorps recombinant humanisé dirigé contre l'intégrine α4, une molécule d'adhésion exprimée par les lymphocytes. L'anticorps bloque leur entrée dans le SNC (Gunnarsson *et al.* 2011). Des essais cliniques sont en cours afin d'évaluer un ensemble d'**anticorps monoclonaux thérapeutiques**, ciblant spécifiquement différents types cellulaires immuns (Coles *et al.* 2006). Le **Daclizumab** est dirigé contre le récepteur à l'IL-2, bloquant ainsi son action et limitant la prolifération des LT. L'**Alemtuzumab** est un anticorps anti-CD52. CD52 étant exprimé à la fois par les LT, les LB et les monocytes, l'anticorps aurait un large spectre immunosuppresseur. Enfin, le **Rituximab** est dirigé contre la molécule CD20 exprimée uniquement par les LB qu'il déplete de façon spécifique. Ces anticorps ont montré leur efficacité sur les formes rémittentes. D'autre part,

des traitements par voie orale sont en développement. Parmi eux, le **Fingolimod** est un agoniste du récepteur de la Sphingosine-1-phosphate qui entraîne la redistribution des lymphocytes. Les lymphocytes naïfs et mémoires restent bloqués dans les organes lymphoïdes secondaires et ne circulent plus dans le sang. Le **Diméthyle fumarate** a la particularité d’agir à la fois par une action anti-inflammatoire et neuro-protectrice via la voie de transcription NRF2 (Nuclear factor erythroid 2-related factor 2), impliquée dans le contrôle du stress oxydatif et l’homéostasie du SI. Le **Laquinimod** supprimerait la réponse des LT de type Th1 et Th17 favorisant une réponse Th2.

Ces nouveaux traitements présentent une bonne tolérance et sont des traitements d’avenir dans les formes rémittentes puisque leur efficacité a été montrée contre les poussées et la charge lésionnelle IRM. Malheureusement, aucune efficacité satisfaisante n’a été démontrée, jusqu’à présent, sur les formes progressives de la maladie.

b. L’atteinte neuronale, une atteinte primitive ?

L’échec des thérapies immuno-modulatrices

Comme nous venons de le voir, les thérapies immuno-suppressives/-modulatrices actuellement prescrites n’ont pas d’effet sur les **formes secondairement progressives** et il n’existe pas d’indication thérapeutique reconnue pour les **formes progressives d’emblée** (Coles *et al.* 2006; Weissert 2013). C’est l’argument majeur qui pousse aujourd’hui les chercheurs à envisager des mécanismes physiopathologiques non auto-immuns et qui a conduit à l’**hypothèse neuro-dégénérative**. Les futures thérapies devront probablement combiner des effets immuno-modulateurs et des effets neuro-protecteurs afin d’entretenir un contexte favorable à la régénérescence neuronale. Malheureusement, les modèles EAE ne sont pas efficaces pour tester des thérapies neuro-protectrices et il convient de développer d’autres modèles animaux de la SEP. Connaissant le lien étroit qu’il existe entre les lésions corticales de la SG et l’inflammation des méninges, il s’agit d’une cible à envisager sérieusement.

L’atteinte axonale en conséquence de la démyélinisation

Le handicap irréversible des patients est sans aucun doute lié, au moins en partie, à l’atteinte axonale, qu’elle soit une conséquence de la démyélinisation ou le reflet d’une atteinte primitive du neurone (Trapp & Nave 2008; Stadelmann & Brück 2008). La démyélinisation entraîne, à court terme, une **modification de l’influx nerveux** de part la disparition de la conduction rapide et saltatoire. Des blocs de conduction normale peuvent persister dans les parties non démyélinisées d’un axone. Une conduction lente peut se rétablir le long de l’axone dénudé, permettant sans doute

une restauration de fonction (Fig. 22B). Les axones démyélinisés deviennent hyperexcitables générant des influx spontanés à l'origine des troubles sensitifs et du signe de Lhermitte. Des potentiels d'action peuvent aussi passer d'un axone démyélinisé à l'autre et perturber la coordination des signaux.

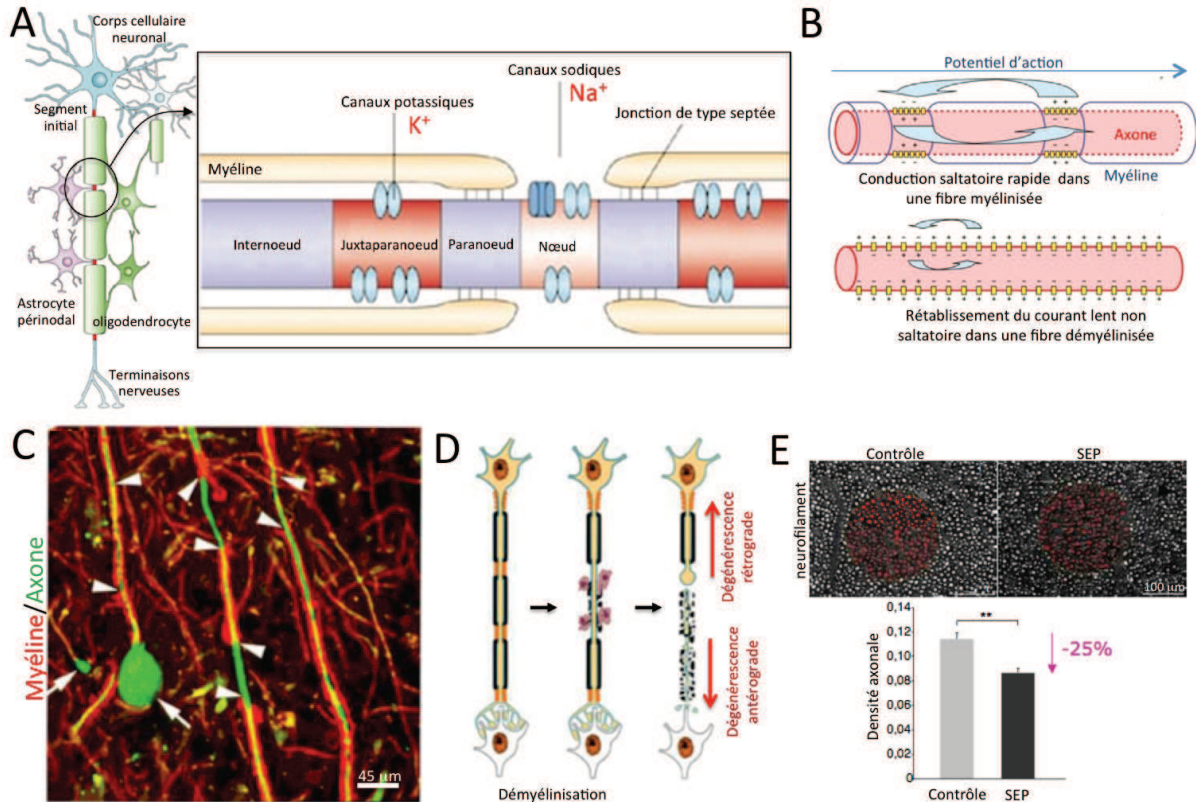


Figure 22 : L'atteinte axonale dans la SEP. A. Organisation du nœud de Ranvier sur un axone myélinisé. Trois régions peuvent se distinguer d'après leur ultrastructure et leur composition : le nœud proprement dit, le paranoëud et le juxtaparanoëud. B. Perte du caractère saltatoire de la conduction électrique le long d'un axone démyélinisé. C. Célèbre image de la souffrance axonale chez des patients atteints de formes rémittentes (extraite de Trapp *et al.* 1998). Les têtes de flèches indiquent des segments axonaux démyélinisés. Les flèches indiquent des bulbes de rétraction axonale caractéristiques des axones sectionnés. D. La démyélinisation peut conduire à la transection axonale. Une fois sectionné, la terminaison distale de l'axone dégénère rapidement (dégénérescence antérograde) et la terminaison proximale peut survivre ou dégénérer (dégénérescence rétrograde ou Wallérienne) (extrait de Trapp & Nave 2008). E. Perte axonale diffuse dans la SBAN (extrait de Androdias *et al.* 2010).

Une **modification de la structure axonale** reflète l'atteinte des axones démyélinisés. L'expression des molécules de surface est modifiée. Prenons l'exemple de l'expression de molécules d'adhésion de type NCAM (neural cell adhesion molecule) dont la disparition est nécessaire avant toute remyélinisation (Charles *et al.* 2000). La démyélinisation entraîne la disparition, par diffusion, des agrégats moléculaires caractéristiques des nœuds de Ranvier (Bouafia *et al.* 2013). En effet, sur un axone myélinisé, les canaux sodiques voltage-dépendants sont concentrés au niveau de la région nodale, les languettes de myéline sont ancrées par des molécules type contactine et neurofascine au niveau de la région paranodale, et les canaux potassiques sont concentrés dans la région juxta-paranodale (Fig. 22A). La redistribution des canaux restaure un

courant persistant non saltatoire. La nature des canaux est également modifiée, le canal sodique Nav1.6 est par exemple remplacé par l'isoforme Nav1.2 (Waxman 2006). La plus forte entrée de Na⁺ augmente la demande en ATP (Adénosine triphosphate) des pompes Na⁺/K⁺ ATPase afin de maintenir les potentiels de membrane.

A long terme, la démyélinisation chronique des axones maintient leur état de souffrance et conduit à leur **dégénérescence** (Dutta & Trapp 2011). L'axone ne peut pas faire face à la **demande énergétique trop importante** et le nombre de mitochondries décroît drastiquement (Dutta *et al.* 2006; Zambonin *et al.* 2011). En effet, la gaine de myéline permet non seulement une conduction rapide mais prévient également, dans une certaine mesure, la perte d'énergie au sein de l'axone (Nave & Trapp 2008). En effet, si la démyélinisation ne tue pas en soi un axone, elle le rend plus vulnérable au stress cellulaire et à la dégénérescence en augmentant la demande en énergie. De même l'oligodendrocyte n'apporte plus le support trophique nécessaire à la survie de l'axone (Nave & Trapp 2008). Le changement des canaux entraîne une entrée anormale de calcium neurotoxique et délétère pour l'axone. Le calcium active notamment des enzymes responsables de la fragmentation des neurofilaments. La plus grande perméabilité membranaire conduit au **gonflement des axones** et donc à une augmentation du diamètre axonal. Il a même été montré jusqu'à la perte des canaux sodiques et des pompes Na⁺/K⁺ avant la dégénérescence complète de l'axone.

Dans les études neuropathologiques, l'atteinte axonale est mesurée par l'accumulation d'APP (Amyloïd precursor protein), signe d'un **dysfonctionnement du transport axonal**. On ne sait pas si les axones APP⁺ sont irréversiblement lésés ou si la régénération est encore possible (Ferguson *et al.* 1997). Une autre méthode consiste à mesurer le **degré de phosphorylations des neurofilaments**. En effet, les axones démyélinisés perdent rapidement ces phosphorylations (Trapp *et al.* 1998). Aussi l'atteinte axonale aboutit à la **transsection axonale**, reconnaissable par la formation de **structures ovoïdes** au niveau des extrémités sectionnées (Fig. 22C) (Trapp *et al.* 1998). La partie de l'axone reliée au corps cellulaire du neurone peut encore survivre ou va dégénérer. On parle alors de **dégénérescence rétrograde ou Wallérienne** (Fig. 22D). L'atteinte axonale décrite ci-dessus a été observée dans les lésions SEP actives de patients atteints de formes rémittentes (Ferguson *et al.* 1997; Trapp *et al.* 1998). Des axones sectionnés étaient déjà observés dans les stades précoces de la maladie. De façon similaire, plus de la moitié des axones, en particulier les petits axones, plus vulnérables, disparaissent dans les lésions chroniques (Lovas *et al.* 2000; Evangelou *et al.* 2005; DeLuca *et al.* 2006). L'atteinte axonale se retrouve dans les formes progressives et est plus prononcée dans les formes secondairement progressives (Bitsch *et al.* 2000). La **perte axonale diffuse** observée dans la SBAN est attribuée en partie à la dégénérescence Wallérienne due à la démyélinisation plus ou moins proche (Fig. 22E) (Evangelou *et al.* 2000; Androdias *et al.* 2010). Du point de vue clinique, la perte axonale précoce ne semble pas avoir

d'impact sur le handicap des patients SEP à formes rémittentes. Avec le temps et l'accumulation des lésions, la perte axonale pourrait conduire à la transition vers les formes progressives lorsque le SNC n'est plus capable de compenser la perte axonale (Nave & Trapp 2008).

Une atteinte primaire du neurone

Bien qu'il soit évident, d'après les arguments précédents, que la démyélinisation participe à l'atteinte axonale et rende l'axone plus vulnérable aux attaques inflammatoires, on se demande encore si la démyélinisation est nécessaire ou suffisante pour induire les dommages axonaux observés ou si des atteintes neuronales seraient indépendantes de la démyélinisation [hypothèse générale H1]. Plus, spécifiquement, le neurone pourrait être une cible à part entière de l'inflammation [hypothèse spécifique H2] et/ou présenter des mécanismes autonomes de mort cellulaire [hypothèse spécifique H3].

H1 : L'indépendance de l'atteinte axonale et de l'atteinte myélinique est soutenue par de nombreux arguments. Le simple fait qu'un axone partiellement démyélinisé soit déjà atteint n'est pas réellement convaincant. Une étude IRM a montré que la répartition du signal de perte axonale est indépendante des variations en densité de myéline (Bergers *et al.* 2002). De la même façon, la perte axonale est souvent observée en absence de pathologie de la myéline (Filippi *et al.* 2000, 2003; Bot *et al.* 2004). Une étude a même observé la perte d'un axone entouré d'une gaine de myéline intacte dans la SBAN (Bjartmar *et al.* 2001). Enfin, le handicap moteur des patients corrèle avec la perte axonale mais pas avec la démyélinisation suggérant différents mécanismes mis en jeu (Bjartmar *et al.* 2000; De Stefano *et al.* 2001; Tallantyre *et al.* 2010).

H2 : Pour comprendre si le neurone est une cible de l'inflammation, une étude a montré que l'atteinte axonale aiguë APP⁺ était corrélée au nombre de macrophages et de LT CD8⁺ dans les lésions mais n'était pas corrélée à l'expression de TNF- α ou de iNOS (enzyme de synthèse inductible de l'oxyde nitrique) considérés comme des vecteurs de la démyélinisation (Bitsch *et al.* 2000). Cette étude suggère, encore une fois, une atteinte axonale indépendante, du moins en partie, de la démyélinisation mais liée à l'inflammation comme l'ont suggérée d'autres études (Trapp *et al.* 1999; Kornek *et al.* 2000, 2001; Geurts *et al.* 2003, 2009). Elle est notamment médiée par les macrophages, les cellules microgliales et les LT cytotoxiques. Un rôle direct des LT CD8⁺ a effectivement été montré sur la transection axonale (Prat & Antel 2005). Il se peut que les axones soient des « victimes collatérales » de l'inflammation globale mais certains auteurs vont jusqu'à supposer une **réponse immune spécifiquement dirigée contre les axones**. En effet, des auto-anticorps contre des composants axonaux ont été retrouvés dans le sang et le SNC de patients (Rawes *et al.* 1997; Mathey *et al.* 2007). Les macrophages attaqueraient alors les axones via les

récepteurs aux fragments constants des anticorps ou les récepteurs au système du complément activé par les anticorps. La présence d'antigènes du SNC dans les ganglions lymphatiques périphériques renforce d'ailleurs l'hypothèse d'une réponse immunitaire secondaire à une atteinte précoce du SNC.

H3 : Concernant l'**atteinte primitive du neurone** proprement dite, un argument de poids est le fait que la dégénérescence Wallérienne ne suffit pas à expliquer l'ampleur de la perte axonale, reflétée par l'atrophie cérébrale, chez les patients. En effet, l'atrophie cérébrale est constatée même chez les patients ayant une faible charge lésionnelle. De plus, les lésions corticales présentent beaucoup moins d'infiltrats inflammatoires que les lésions de la SB (Bø *et al.* 2003b). Elles sont associées à une apoptose neuronale, une réduction du nombre de neurones et de la densité synaptique (Peterson *et al.* 2001; Vercellino *et al.* 2005; Wegner *et al.* 2006). Des modèles expérimentaux neuro-dégénératifs non-inflammatoires ont aussi permis de reproduire des lésions de démyélinisation (Baumann & Pham-Dinh 2001; Ip *et al.* 2007). Enfin, les hypothèses mécanistiques qui sous-tendent la neuro-dégénérescence dans la SEP se résument en quelques points : une **déficience mitochondriale**, une vulnérabilité accrue au **stress oxydatif** ou à l'**excitotoxicité du glutamate**, une accumulation toxique de **fer** dans le SNC (Lassmann & van Horssen 2011). L'hypothèse du déficit énergétique s'expliquerait par une délétion de l'ADN mitochondrial neuronal conduisant à des mitochondries non fonctionnelles (Mahad *et al.* 2009; Campbell *et al.* 2011).

Enfin, qu'elle soit systémique ou spécifique des neurones, qu'elle soit primaire ou secondaire à la dégénérescence neuronale, l'implication de l'inflammation dans la pathologie axonale est d'une importance majeure pour les stratégies thérapeutiques futures. En effet, ces thérapies devront conjuguer des effets immuno-modulateurs à une action neuro-protectrice ciblant directement l'axone. Un essai clinique avec des antiépileptiques, bloqueurs de canaux sodiques, n'a malheureusement pas montré d'effet concluant. A ce sujet, la mesure des effets neuro-protecteurs n'est pas encore opérationnelle en clinique. Sont actuellement testés des marqueurs *in vivo* de l'intégrité axonale comme la quantité de NAA ou l'atrophie cérébrale et médullaire.

L'atteinte des motoneurones

Une attention particulière doit être portée à l'atteinte des **neurones moteurs corticaux**, de la moelle épinière ou du tronc cérébral qui, du fait de la longueur de leurs axones, sont possiblement plus **sensibles à la destruction myélinique**. Le poids des lésions corticales dans le handicap des patients s'explique par une forte perte neuronale et gliale dans ces lésions. On y observe également une importante **dégénérescence synaptique** autour des neurones moteurs (Wegner *et al.* 2006). La

perte des neurones moteurs médullaires a été démontré chez les patients par électrophysiologie (Shefner *et al.* 1992; Vogt *et al.* 2009). Dans les modèles EAE, la perte des motoneurons de la corne antérieure, bien que contestée par certains auteurs, est caractérisée par des anomalies morphologiques des dendrites et par une phosphorylation anormale des neurofilaments (Bannerman *et al.* 2005; Vogt *et al.* 2009). Une étude propose que ces altérations soient médiées par les LT CD3⁺ via l'expression du ligand TRAIL (TNF-related apoptosis-inducing ligand) et l'induction des voies apoptotiques (Vogt *et al.* 2009). Des **mécanismes de compensation** permettent de retarder la progression des symptômes liés à une atteinte des voies motrices. Ces mécanismes relèvent de la suppléance fonctionnelle, par recrutement de nouveaux réseaux synaptiques, et de la réparation tissulaire. Il a ainsi été montré qu'une lésion du tractus cortico-spinal chez l'animal induisait un véritable remodelage axonal indispensable aux processus de réparation (Kerschensteiner *et al.* 2004).

c. Les atteintes focales et diffuses, des frontières floues ?

L'atteinte diffuse du SNC

En dehors des lésions focalisées de la SEP, des **altérations diffuses** ont été mises en évidence au sein même de la SBAN et de la SGAN dans les études IRM et neuropathologiques. On peut se demander si ces altérations **résultent du développement des lésions ou sont indépendantes des plaques**. Nous venons de décrire la perte axonale diffuse observée chez les patients en dehors des lésions de démyélinisation (Losseff *et al.* 1996; Brück *et al.* 1997; Fu *et al.* 1998; Evangelou *et al.* 2000; Bjartmar *et al.* 2000; Pelletier *et al.* 2003; Kutzelnigg *et al.* 2005; Androdias *et al.* 2010). Une partie de cette perte axonale est attribuée à la **dégénérescence secondaire à la perte de myéline** en amont ou en aval du site observé. Une hypothèse alternative serait la **propagation diffuse des atteintes tissulaires** et/ou de l'inflammation ou encore l'initiation de microlésions. En effet, des études longitudinales ont montré que des **changements précoces** au sein de la SB pouvaient précéder l'apparition d'une lésion active classique rehaussée au Gadolinium (Narayanan *et al.* 1997; Filippi *et al.* 1998). De même, les atteintes diffuses de la SB se développent de manière extensive même chez les patients ayant peu de lésions focalisées. On suppose donc qu'elles se développent, au moins en partie, indépendamment des lésions focalisées (Rovaris *et al.* 2001b; Pelletier *et al.* 2003; Rocca *et al.* 2003; Kutzelnigg *et al.* 2005).

Au niveau moléculaire, les études d'expression transcriptomique ont montré des **altérations majeures de l'homéostasie cellulaire et tissulaire de la SBAN**. Ces anomalies reflètent une consommation énergétique accrue, un stress oxydatif, une production augmentée d'oxyde nitrique

(NO) et de peroxy-nitrite, la mise en place d'une signalisation anti-apoptotique neuro-protectrice en réponse à des situations ischémiques, des modifications de l'homéostasie ionique touchant en particulier les oligodendrocytes ainsi que des altérations gliales (Graumann *et al.* 2003; Zeis *et al.* 2008a). Le rôle ambivalent de nombreuses molécules comme le NO, protecteur à faible dose et toxique à forte dose, complique la compréhension des mécanismes mis en jeu. Enfin, des changements diffus ont aussi été observés dans les modèles EAE et pourront donc être éclaircis dans de futures études (Zeis *et al.* 2008b).

On peut également se demander si l'atteinte tissulaire diffuse observée chez les patients SEP est liée à une **composante inflammatoire**, elle aussi **diffuse**. En effet, des **signaux pro-inflammatoires** (STAT4, IL-1 β , M-CSF, RANTES), **anti-inflammatoires et neuro-protecteurs** (STAT6, IL-10, TGF- β) coexistent au sein de la SBAN et de la SGAN (Zeis *et al.* 2008a, 2009). Des LT infiltrants sont présents en faible quantité comme les infiltrats périvasculaires de cellules mononucléées. S'y ajoutent une **activation majeure des cellules microgliales**, reflétée notamment par la surexpression de STAT4 et par la formation de nodules microgliaux (Kutzelnigg *et al.* 2005). STAT6 est, lui, exprimé par les oligodendrocytes, témoignant de leur participation à la dérégulation de la réponse immune au sein de la SBAN (Zeis *et al.* 2008a). Ainsi, un environnement inflammatoire diffus est maintenu par les cellules immunes mais aussi par les cellules gliales résidentes. De plus, l'inflammation diffuse est bien plus prononcée dans les formes progressives que dans les formes rémittentes de la maladie. Or, les dommages cellulaires diffus sont plus nombreux dans les formes progressives. Cette corrélation suggère que l'inflammation diffuse participe à la progression lente de l'atteinte diffuse, également corrélée à la démyélinisation corticale (Kutzelnigg *et al.* 2005). Néanmoins, l'atteinte diffuse ne peut être exclusivement une conséquence de l'installation chronique de la maladie, étant déjà observée à des stades précoces de la maladie (De Stefano *et al.* 2001; Filippi *et al.* 2003; Zeis *et al.* 2009).

Cette vision suggère deux types de réactions inflammatoires superposées. La **première** correspondrait à des **vagues d'inflammation massive** conduisant à la formation de nouvelles lésions, rehaussées par un agent de contraste IRM et associées à une rupture de la BHE. Elle se produirait majoritairement pendant les phases de poussées et rarement pendant la phase progressive (Thompson *et al.* 1991, 1997; Cotton *et al.* 2003). La **seconde** correspondrait à l'**inflammation diffuse** associée à l'inflammation méningée. En effet, pendant la phase progressive, les cellules immunes continuent de s'accumuler dans le SNC et semblent échapper au contrôle du SI périphérique. L'aspect relativement intact de la BHE dénote des altérations subtiles, non détectées en IRM, et participe à la compartimentation de l'inflammation dans le SNC, ce qui pourrait expliquer que cette phase soit peu sensible aux traitements immuno-modulateurs (Kutzelnigg *et al.* 2005).

Les frontières plaques/SBAN

La notion de périplaque

Une zone encore mystérieuse reste à étudier : la rencontre entre la SBAN et les contours des plaques de démyélinisation (Nijeholt *et al.* 2001; Frohman *et al.* 2006). Un consensus qualifie cette zone frontalière de **périplaque** mais il reste encore une ambiguïté sur l'ampleur topographique de la zone. A première vue, il semble évident de considérer cette frontière comme abrupte tant les différences plaques/SBAN sautent aux yeux en terme de myélinisation. Dans la description classique des plaques, telles qu'elle est proposée dans les schémas explicatifs, les oligodendrocytes et les gaines de myéline sont considérées comme intactes à proximité immédiate de zones totalement démyélinisées et déplétées en oligodendrocytes. Pourtant, cette image n'est pas conforme à la réalité observable au niveau de la plupart des lésions SEP. En effet, s'il est bien connu que les lésions actives présentent un bord flou, **une zone de nature intermédiaire entre la SBAN et les plaques**, d'épaisseur variable, entoure n'importe quelle plaque. Cette zone est caractérisée par une pâleur du marquage LFB ou une densité intermédiaire de certains marqueurs de la myéline.

Derrière une densité intermédiaire de myéline se cachent plusieurs interprétations. Certaines études se sont intéressées aux processus de remyélinisation active que l'on peut observer en zones satellites des plaques étendues (Prineas & Connell 1979; Brück *et al.* 2003; Patrikios *et al.* 2006; Henderson *et al.* 2009). Les plaques de **remyélinisation** sont fréquentes dans les phases précoces de la maladie et le deviennent de moins en moins au fur et à mesure que la maladie évolue (Prineas *et al.* 1993). Une seconde hypothèse est la **dégénérescence Wallérienne** conduisant à une perte myélinique secondaire qui n'est pas nécessairement liée à la plaque adjacente. Enfin, une dernière hypothèse consiste en un **processus de démyélinisation lente** des axones qui participe à l'extension des lésions. La compréhension de la nature de cette zone sera décisive pour élucider les mécanismes qui permettent l'arrêt ou la poursuite de la propagation d'une lésion ou au contraire la propagation des processus de réparation. On comprend donc les enjeux thérapeutiques associés.

La substance blanche d'apparence douteuse (SBAD)

De la même façon, il existe des zones de signaux IRM intermédiaires, entre le signal produit par la SBAN et celui des lésions classiques, détectées par les nouvelles techniques d'analyse (Fig. 23A) (Zhang *et al.* 2013a). Il s'agit d'un **signal intermédiaire en séquence T2**, associé à une diminution du marquage LFB, une faible diminution du marquage MBP et axonal (Moore *et al.* 2008; Laule *et al.* 2011). Le signal IRM est également intermédiaire en séquence T1, pour le ratio

de transfert magnétique (MTR), le coefficient apparent de diffusion (ADC), et l'anisotropie fractionnelle (FA) (Ge *et al.* 2003; Vrenken *et al.* 2010). Au sein de ces zones le plus souvent localisées au pourtour des lésions, il existe une graduation de l'intensité des signaux depuis la lésion vers la SBAN (Fig. 23C) (Ge *et al.* 2003; Zhang *et al.* 2013a).

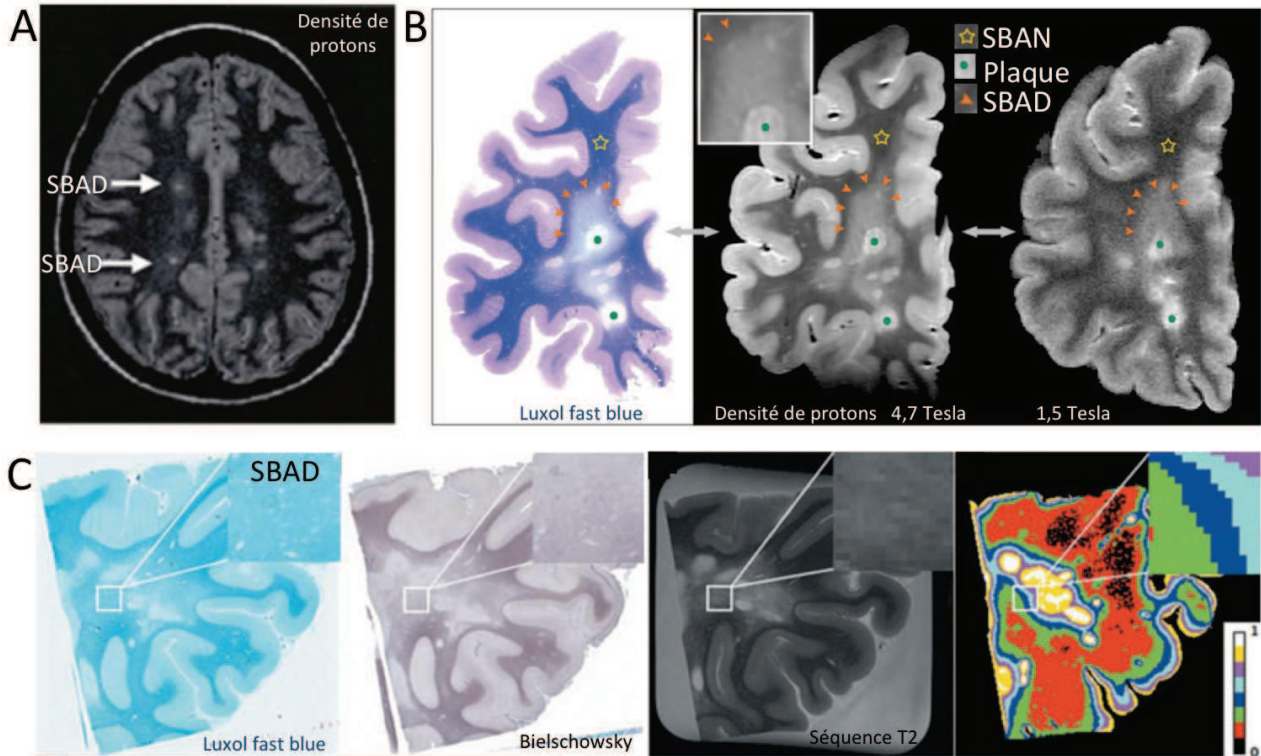


Figure 23 : La SBAD dans la SEP. **A.** Image d'IRM cérébrale (Ge *et al.* 2003). Le signal de type SBAD entourent deux lésions classiques de démyélinisation focalisée. **B.** Corrélation histo-radiologique de la SBAD (Seewann *et al.* 2009). Une section de tissu colorée au Luxol fast blue pour la myéline a été scannée en IRM associant ainsi le signal SBAN à une plus faible densité de myéline. **C.** Démonstration d'un gradient d'altérations dans la SBAD (adapté de Zhang *et al.* 2013a). Comme précédemment, une section de tissu colorée au Luxol fast blue pour la myéline et par la technique de Bielschowsky pour les axones a été scannée par IRM. Une cartographie de la texture détectée montre le gradient qu'il existe au sein de la SBAD. La barre de couleurs indique le niveau d'hétérogénéité.

Qu'en est-il de l'interprétation de ces signaux ? Certains auteurs proposent qu'ils reflèteraient une perte de myéline, une perte axonale, une activation microgliale modérée et une gliose chronique fibrillaire en absence de pathologie aiguë de l'axone, en absence de remyélinisation et d'altération de la BHE (Seewann *et al.* 2009; Filippi & Rocca 2010). Ces auteurs ont qualifié ces altérations tissulaires de **substance blanche d'apparence douteuse (SBAD** ou « **Dirty appearing white matter** ») (Ropele *et al.* 2000; Ge *et al.* 2003; Moore *et al.* 2008; Seewann *et al.* 2009; Filippi & Rocca 2010; Vrenken *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2013a). Plusieurs études ont tenté de relier un substrat pathologique au signal observé dans la SBAD (Fig. 23B). Souvent observée autour des lésions, on suppose que la SBAD est une forme d'évolution des lésions ou bien qu'elle résulte des changements post-inflammatoires associés au passage d'une

lésion active vers une lésion chronique (Ge *et al.* 2003). L'observation de ces mêmes signaux, non associés à une plaque, pourrait être le signe de la formation de nouvelles lésions pré-actives, ou micro-lésions, ou du moins, un stade inflammatoire précoce (Ropele *et al.* 2000; Ge *et al.* 2003). D'autres auteurs lui associent une forme de dégénérescence axonale, secondaire à la perte de myéline adjacente ou distante (Papanikolaou *et al.* 2004; Karampekios *et al.* 2005; Vrenken *et al.* 2010). On peut penser que ces mécanismes se superposent dans la SBAD et qu'il sera difficile de distinguer s'il s'agit de lésions microscopiques multiples ou d'une entité pathologique à part entière (Vrenken *et al.* 2010). Il n'y a pas de preuve définitive que la SBAD précède la formation d'une plaque mais il y a des arguments pour penser qu'elle reflète une pathologie chronique différente des mécanismes impliqués dans la plaque (Seewann *et al.* 2009; Vrenken *et al.* 2010).

En IRM, le volume de la SBAD n'est pas négligeable, dépassant souvent le volume des plaques T2 (Ge *et al.* 2003), et bien qu'il ne soit pas corrélé au score clinique, on comprend son importance potentielle dans le handicap et la progression clinique des patients (Ge *et al.* 2003; Laule *et al.* 2011). La SBAD s'observe majoritairement chez les patients en phase progressive mais aussi en phase rémittente. Elle serait plus sévère chez les patients en phase secondairement progressive que chez ceux en phase progressive d'emblée (Vrenken *et al.* 2010). Des études longitudinales pourront probablement nous aider à comprendre la cinétique de formation des plaques et de la SBAD associée. En attendant, il faut rester prudent quant aux études relatives à la SBAN et être conscient qu'elles pourraient inclure des altérations de type SBAD, non détectées avec les anciennes techniques d'IRM.

Cette première partie donne une idée de la complexité des mécanismes cellulaires mis en jeu dans la physiopathologie de la SEP et de la diversité des approches que nécessite leur compréhension. La SEP n'est pas une simple maladie inflammatoire : les processus neuro-inflammatoires et neuro-dégénératifs semblent s'imbriquer et alimenter un cercle vicieux dont il est impossible de sortir. La recherche reste donc très active tant les zones d'ombre sont encore nombreuses, en particulier pour tenter de freiner la phase progressive de la maladie. Le congrès européen de la recherche sur la SEP (ECTRIMS) réunit chaque année près de 10 000 personnes. En France, la fondation ARSEP soutient sans relâche les équipes de recherche et participent à l'information des malades et du public sur la maladie.

II. Le dialogue des cellules gliales dans le développement des lésions SEP

A/ Les cellules gliales

Les **cellules gliales**, qui représentent 90% des cellules du SNC humain, ont longtemps été considérées comme une simple « glue » cérébrale leur conférant un caractère moins noble que les neurones. En 1856, Rudolf Virchow décrivait pour la première fois des cellules non neuronales dans le SNC (Somjen 1988). Un demi-siècle plus tard, Rio Hortega identifiait les différentes cellules gliales longuement étudiées par la suite (Fig. 2F). On sait aujourd'hui que ces cellules ne sont pas là uniquement pour remplir l'espace mais bien pour assurer la mise en place et le maintien des circuits neuronaux et participer activement au transfert de l'information. Comme présenté dans la figure 24, on distingue la **microglie**, cellule immune du SNC, de la **macroglie**, regroupant les astrocytes, les oligodendrocytes et les polydendrocytes NG2⁺, considérés depuis peu comme le quatrième grand type de populations gliales. Les cellules épendymaires, bordant les ventricules, sont parfois incluses dans les cellules gliales. Dans ce chapitre, nous verrons les fonctions principales et l'origine des cellules gliales mais nous ne rentrerons pas dans le débat de savoir si Albert Einstein doit son génie à son plus grand nombre de cellules gliales.

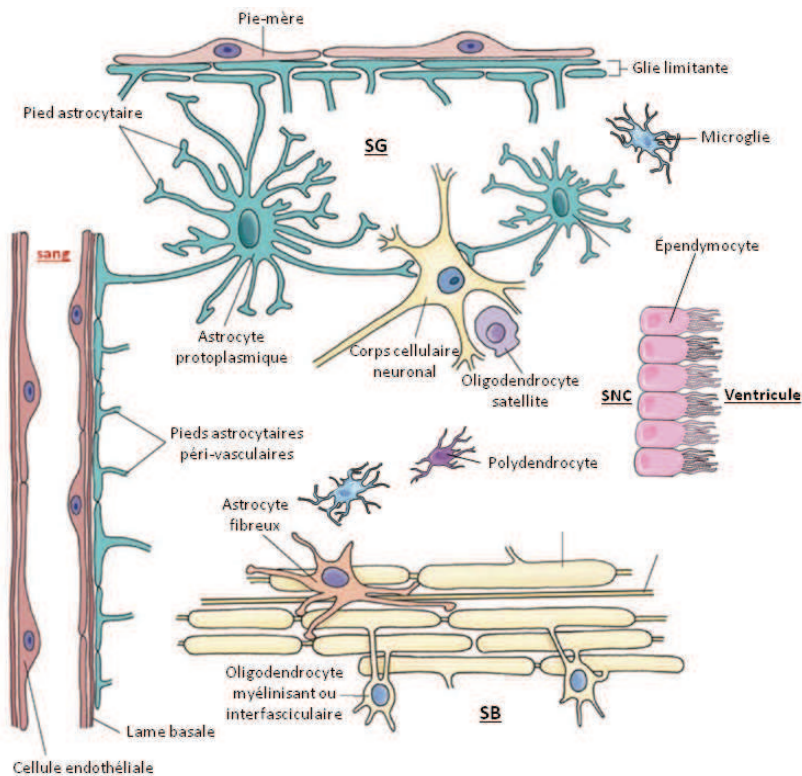


Figure 24 : Les cellules gliales du SNC.

1) Deux grands acteurs de la macroglie : oligodendrocyte et astrocyte

a. Les oligodendrocytes, des isolants déterminants

De beaux manteaux pour les neurones

Caractéristiques morphologiques des oligodendrocytes

Le terme d'« oligodendroglia » a été introduit par Rio Hortega. Les oligodendrocytes sont les **cellules myélinisantes** du SNC comme les cellules de Schwann le sont dans le SNP (Baumann & Pham-Dinh 2001). Leurs prolongements cytoplasmiques s'enroulent autour des axones, et non des dendrites, pour former des gaines de myéline. La superposition en spirale de membranes plasmiques crée une structure compacte riche en lipides et à faible teneur en eau lui conférant ses propriétés isolantes. Véritables **isolants électriques**, les gaines de myéline assurent une conduction rapide du message nerveux, sans perte d'énergie, pouvant parcourir quelques centaines de mètres par seconde.

La formation des gaines de myéline est une innovation évolutive décisive. En effet, la plus grande majorité des vertébrés possèdent des axones myélinisés excepté quelques lamproies (Baumann & Pham-Dinh 2001). La première structure ressemblant à une gaine de myéline est apparue il y a 400 millions d'années. Même si certains invertébrés présentent une sorte de gainage glial autour des axones, une conduction plus rapide, chez les invertébrés, est associée à une augmentation du diamètre axonal. Au contraire, la gaine de myéline garantit une conduction rapide et hautement fidèle sur de longues distances dans un espace minimal.

Le long d'un axone, les segments myéliniques, ou régions internodales, se succèdent, laissant de petites parties axonales dénudées que l'on appelle les **nœuds de Ranvier** (Fig. 25A). Cette disposition segmentée permet la **conduction saltatoire** de l'influx nerveux le long d'un axone myélinisé (Fig. 22B). Un oligodendrocyte forme jusqu'à une centaine de segments de myéline sur des axones différents, le nombre dépendant des régions cérébrales. Les oligodendrocytes myélinisants, dits **interfasciculaires**, sont principalement localisés dans la SB. On en distingue plusieurs types en fonction du nombre ou de l'épaisseur des gaines formées. Observée au microscope électronique, chaque gaine de myéline est caractérisée par la superposition de lignes denses majeures, correspondant à l'espace intra-cytoplasmique, et de lignes denses mineures, correspondant à l'espace extracellulaire (Fig. 25C). Les espaces de Schmidt-Lanterman, correspondant à des espaces cytoplasmiques non compactés de la gaine, nombreux dans le SNP, sont très rares dans le SNC. Néanmoins, la myéline du SNC reste moins compactée au niveau des

boucles para-nodales, libérant des espaces cytoplasmiques. C'est à ce niveau que l'adhésion des gaines de myéline sur l'axone est la plus forte, par la mise en place de jonctions de type septé (Fig. 25B). Elles sont indispensables pour assurer le maintien de l'organisation nodale et para-nodale de l'axone (Davis & Lambert 1996). Au niveau du nœud de Ranvier, un renflement axonal, exposé au milieu extérieur, établit des contacts avec des pieds astrocytaires ou d'autres cellules gliales. Les canaux sodiques à l'origine de la conduction des potentiels d'action sont concentrés dans la région nodale. Les canaux potassiques ainsi que les pompes Na^+/K^+ sont davantage répartis le long de l'axone, principalement dans les régions paranodales et juxtapanodales.

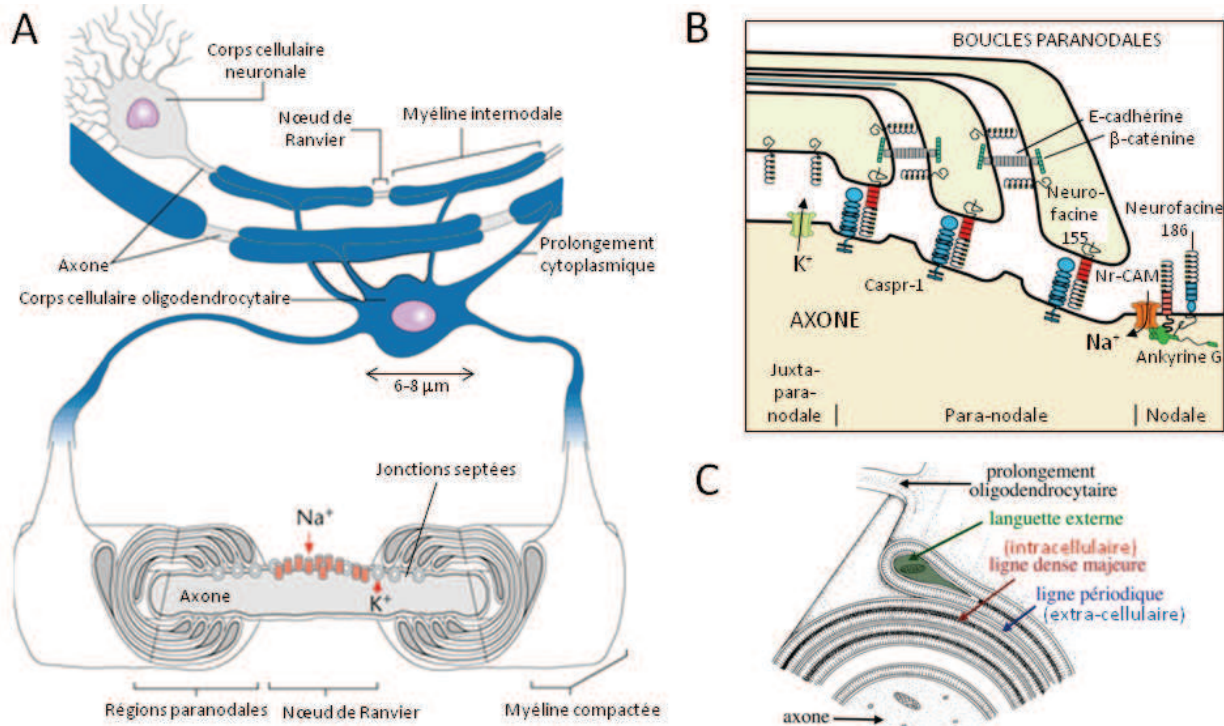


Figure 25 : Caractéristiques des oligodendrocytes. **A.** Organisation des gaines de myéline autour des axones (figure adaptée de Szuchet *et al.* 2001). Entre deux nœuds de Ranvier, un segment de myéline mesure entre 150 et 200 μm de longueur. Le corps oligodendrocytaire mesure moins de 8 μm de diamètre. **B.** Organisation moléculaire des boucles paranodales (adaptée de Trapp & Kidd 2000). Les boucles de myéline sont connectées entre elles par des jonctions adhérentes formées de cadhérines et caténines. Les jonctions de type septé assurant l'adhésion de la gaine de myéline à l'axone sont formées de Caspr-1 (Contactin-associated protein 1) et de Neurofascines. D'autres Neurofascines, des protéines d'ancrage comme l'Ankyrine G et des molécules d'adhésion comme Nr-CAM (Neuronal cell adhesion molecule) participent au maintien des canaux sodiques dans la région nodale. **C.** Observation des gaines de myéline au microscope électronique. On observe une alternance de lignes claires extracellulaires et de lignes denses intracellulaires (jusqu'à 40 tours). La périodicité est d'environ 12 nm.

Composition de la myéline

La myéline est le constituant essentiel de la SB. Depuis que des techniques ont été mises au point pour isoler la myéline, sa composition a été étudiée de près. La myéline est une structure peu hydratée (40% d'eau) dont la masse sèche comprend 70% de lipides et 30% de protéines. Ce ratio lipides/protéines est spécifique de la myéline. Il est inversé dans les membranes plasmiques ordinaires. La myéline est composée des lipides retrouvés dans les autres membranes, cholestérol et

phospholipides. Une des spécificités de la myéline est la richesse en **glycosphingolipides** comme les galactocéramides (GalC) et la présence de quelques galactolipides. Des dérivés des GalC comme les gangliosides GM1 et GM4 sont utilisés comme marqueurs de la myéline. Comme les lipides, des protéines principales de la myéline, incluant **PLP**, **MAG** et **CNP** (Cyclic nucleotide phosphodiesterase), ont des propriétés hydrophobes de par leurs groupements acyles. **MBP** et **PLP** représentent 80% des protéines de la myéline et en sont spécifiques (Fig. 8A). **MBP** est une des protéines les plus abondantes du CNS. Elle est présente sous plusieurs isoformes issus d'un épissage alternatif (Carnegie 1971). Elle est réexprimée précocement en cas de remyélinisation. **PLP**, ou son autre isoforme **DM20**, sont indispensables à la compaction de la gaine de myéline. **CNP** est plutôt localisée dans le cytoplasme non compacté des oligodendrocytes. Sa surexpression perturbe la différenciation oligodendrocytaire mais le substrat de cette enzyme n'est pas connu (Gravel *et al.* 1996). Des glycoprotéines, comme **MAG** et **MOG**, sont aussi spécifiques de la myéline mais beaucoup moins abondantes (Fig. 8A). **MAG** serait impliquée dans l'interaction oligodendrocyte-neurone, notamment dans l'initiation de la myélinisation (Li *et al.* 1994).

Formation des gaines de myéline

Un même axone est myélinisé par différents oligodendrocytes de manière non simultanée et un même oligodendrocyte peut protéger différents axones avec des prolongements à des stades de compaction variés, donnant lieu à une **mosaïque de différenciation**. Ainsi, le processus de myélinisation est si complexe que ces mécanismes de régulation ne sont pas encore tous compris (Baumann & Pham-Dinh 2001). La première étape consiste en la reconnaissance de l'axone à myéliniser par l'oligodendrocyte, qui migre le long de l'axone puis y adhère. Ce n'est qu'à cette étape que les **pré-oligodendrocytes** deviennent immatures et acquièrent des **marqueurs spécifiques** (Fig. 27). Ensuite, les prolongements cytoplasmiques s'enroulent en spirale autour de l'axone, sur un espace pré-déterminé. Des marqueurs tardifs de la différenciation, comme la protéine **MOG**, apparaissent alors. Les oligodendrocytes sont capables *in vitro* de myéliniser des axones isolés du corps cellulaire neuronal suggérant une reconnaissance spécifique de l'axone (Lubetzki *et al.* 1993). L'interaction axone-oligodendrocyte via des protéines membranaires, notamment des isoformes de neurofascines et des protéines associées aux microtubules (**MAP**), entraîne le remaniement du cytosquelette oligodendrocytaire. Des arguments suggèrent que la voie Notch, plus connue dans le développement neuronal, et l'activité électrique du neurone réguleraient l'initiation de la myélinisation (Schwab & Schnell 1989; Barres & Raff 1993). En effet, les oligodendrocytes sont sensibles à l'activité neuronale car ils sont capables de capter des neurotransmetteurs.

Les axones participent probablement dans la régulation de l'épaisseur de la gaine de myéline. Par exemple, les axones les plus gros ont une gaine de myéline plus épaisse (Waxman & Sims 1984) ; il semblerait que l'information du diamètre axonal soit contenue dans un signal lors de la formation de la gaine de myéline. Dans le SNP, cette information consiste en l'interaction entre la Neuréguline 1 axonale et des protéines de type ErbB des cellules de Schwann, mais elle n'aurait pas le même rôle dans le SNC (Nave & Salzer 2006; Brinkmann *et al.* 2008). Néanmoins, une régulation similaire serait à l'origine du maintien du ratio diamètre axonal/diamètre de l'axone myélinisé, ou **g-ratio**, constant pour une espèce, entre 0,6 et 0,7 pour les mammifères.

Au niveau biochimique, l'assemblage de la myéline nécessite la coordination des enzymes du métabolisme lipidique, de la synthèse et du transport des protéines de la myéline dans les prolongements oligodendrocytaires. D'une part, des **complexes lipoprotéiques**, ressemblant aux radeaux lipidiques, sont formés au sein des membranes intracellulaires puis exportés dans les prolongements, tout en conservant l'asymétrie des bicouches lipidiques : les glycolipides et les sphingolipides sont plutôt extracellulaires alors que les autres phospholipides sont intracellulaires. D'autre part, l'ancrage et les modifications post-traductionnelles des protéines, comme la méthylation de MBP, seraient déterminants pour une compaction fonctionnelle de la gaine de myéline (Campagnoni *et al.* 1993). Autre exemple, une mutation dans le gène codant pour la protéine PLP conduit à une compaction anormale des gaines de myéline observée chez des modèles animaux spontanés (Boison & Stoffel 1994) ou chez les patients atteints de la maladie de Pelizaeus-Merzbacher. L'absence de MAG semble retarder la compaction myélinique (Li *et al.* 1994). Certains patients, développant la maladie de Charcot, possèdent des auto-anticorps dirigés contre MAG entraînant la décompaction de la myéline. Ainsi, la protéine MAG jouerait un rôle dans la reconnaissance des axones myélinisés ou non myélinisés.

Les autres fonctions des oligodendrocytes

Oligodendrocytes et support trophique des axones

Certains oligodendrocytes, en particulier dans la SG, ne sont pas myélinisants et sont impliqués dans la régulation du microenvironnement péri-neural (Baumann & Pham-Dinh 2001). Outre ces **oligodendrocytes satellites**, les oligodendrocytes myélinisants n'assurent pas uniquement la conduction saltatoire du message nerveux ; ils apportent également un **support physique** aux neurones. En effet, ils sont nécessaires au maintien du transport axonal et à la survie des axones (Nave 2010). Pour preuve, les souris déficientes pour la protéine PLP présentent des altérations axonales. Leur rôle structural est permis par la richesse en microtubules des oligodendrocytes et la compaction de la myéline.

Nave (2010) suggère également que les oligodendrocytes sont indispensables au **métabolisme énergétique** mitochondrial des axones, ce qui pourrait expliquer la dégénérescence axonale observée dans les maladies démyélinisantes (Fig. 26). Les axones, en partie à cause des gaines de myéline, sont isolés métaboliquement du reste du neurone. Les oligodendrocytes pourraient fournir des métabolites riches en énergie, comme le pyruvate, le lactate ou leurs dérivés, aux axones, participant au maintien de la balance énergétique de toute la région inter-nodale, où sont réparties les pompes Na^+/K^+ ATPase, les plus grandes consommatrices en énergie de l'axone (Tachikawa *et al.* 2004; Funfschilling *et al.* 2013). Si l'apport métabolique des astrocytes pour les neurones est bien connu (Magistretti & Pellerin 1999), on s'interroge, aujourd'hui, sur la façon dont les oligodendrocytes assurent ce **support trophique**. Les oligodendrocytes sont de plus petites cellules que les astrocytes et l'absence de fibres de collagène démontre qu'ils n'ont pas le même rôle de réserve énergétique dispensé par les astrocytes. Pourtant, les oligodendrocytes forment un véritable réseau avec les astrocytes (Fig. 26) : leurs cytoplasmes sont couplés par des jonctions communicantes, ou jonctions gap, formées de connexines, qui laissent passer de petits métabolites, transportés et métabolisés du sang vers la myéline par ce réseau (Nave 2010). Plus précisément, les oligodendrocytes expriment principalement les connexines Cx47 et Cx29 au niveau du corps cellulaire et Cx32 également au niveau de la myéline (Fig. 28D). Des leukodystrophies paralysantes, causées par des mutations de Cx47, suggèrent que le couplage astrocyte-oligodendrocyte est indispensable à la myélinisation correcte et à la survie axonale. Les métabolites seraient stockés dans les espaces cytoplasmiques de la myéline, notamment l'espace péri-axonal et les boucles para-nodales, puis fournis aux axones (Fig. 26). En échange, les axones fourniraient du NAA aux oligodendrocytes métabolisé en aspartate et acétate nécessaire à la synthèse de la myéline (Jalil *et al.* 2005).

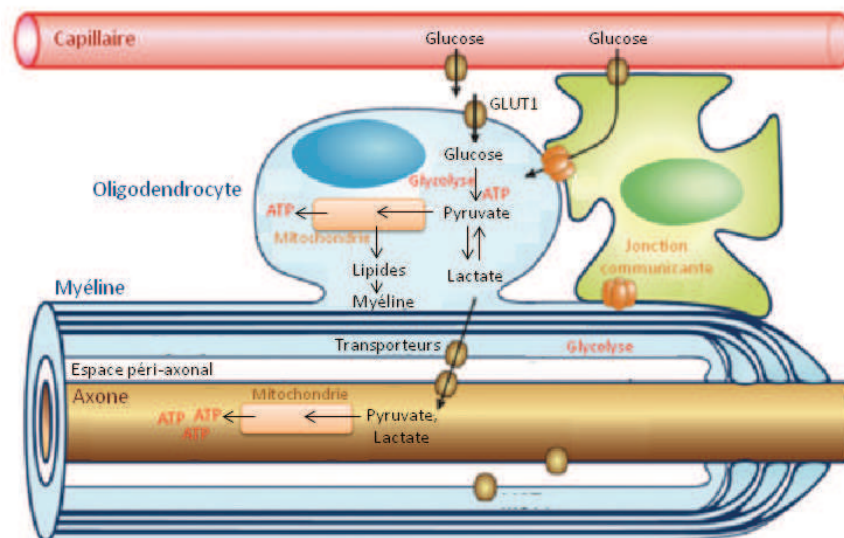


Figure 26 : Oligodendrocytes et support trophique des axones. Les oligodendrocytes permettent de stocker transitoirement le pyruvate et le lactate, les métabolites énergétiques, nécessaires au fonctionnement de l'axone (figure adaptée de Funfschilling *et al.* 2013).

Oligodendrocytes et développement axonal

Les oligodendrocytes participent également au développement axonal. Un signal oligodendrocytaire, indépendant de la myéline, favoriserait la croissance axonale en induisant l'organisation du réseau axonal de neurofilaments et régulerait ainsi le calibre axonal (Sánchez *et al.* 1996). De même, les oligodendrocytes, jouent un rôle dans la mise en place de l'organisation nodale et paranodale de l'axone (Coman *et al.* 2006). Pendant la croissance axonale, l'agrégation des canaux sodiques au niveau des nœuds de Ranvier précéderait la compaction de la myéline. Paradoxalement, les oligodendrocytes semblent aussi inhiber la croissance axonale de certains neurones en stade tardif de développement, ce qui pourrait permettre le maintien ou l'affinage des tractus déjà établis (Schwab & Schnell 1989). De même, après à une atteinte du SNC adulte, la myéline inhiberait la régénérescence axonale (Bandtlow *et al.* 1990). Par exemple, la protéine MAG inhibe la repousse axonale après une lésion du SNC (Qiu *et al.* 2000).

Richardson va jusqu'à qualifier les oligodendrocytes de **glie motrice** tant les développements de l'axone et de la myéline sont liés entre eux. La myélinisation accompagnerait les processus de plasticité neuronale nécessaire aux processus cognitifs comme l'apprentissage (Emery 2010; Richardson *et al.* 2011; Young *et al.* 2013). Effectivement, le volume de la SB diminue avec l'âge en parallèle avec les fonctions cognitives. Ceci pourrait s'expliquer par un dysfonctionnement axonal associé à une perte progressive de l'ensemble des fonctions assurées par les oligodendrocytes.

L'origine des oligodendrocytes

Chez l'humain, le développement des oligodendrocytes commence pendant la deuxième partie de la grossesse. Leur différenciation a majoritairement lieu pendant la première année de vie du développement post-natal, et continue pendant 20 ans pour certaines aires corticales les plus complexes. La séquence spatio-temporelle de la myélinisation est extrêmement précise si bien qu'il est possible de déterminer l'âge d'un fœtus en fonction des tractus qui sont ou non myélinisés. Elle se déroule selon l'axe caudorostral dans le cerveau et rostrocaudal dans la moelle épinière.

Les oligodendrocytes dérivent de cellules **précurseurs**, appelées **OPC**, puis de **progéniteurs** qui migrent, se divisent, mûrissent et enfin, se différencient en cellules myélinisantes (Fig. 27). Les OPC trouvent leur origine dans les cellules neuro-épithéliales des zones ventriculaires pendant le développement embryonnaire (Richardson *et al.* 2006). Les progéniteurs d'oligodendrocytes proviennent majoritairement de la zone sous-ventriculaire. Ils vont migrer sur de longue distance et peupler le cerveau en développement. Les neurones et les astrocytes fournissent les facteurs de croissance nécessaires à la prolifération et à la différenciation des

oligodendrocytes comme le PDGF (Platelet-derived growth factor) ou le FGF (Fibroblast growth factor). Les sous-populations du lignage oligodendrocytaire se distinguent par différents marqueurs. La protéine **Nestin**, exprimée par les précurseurs gliaux comme la glie radiaire, est fortement exprimée dans les OPC qui prolifèrent. La protéine de myéline PLP est déjà exprimée par les oligodendrocytes matures, non encore différenciés. Le récepteur au PDGF (**PDGFR**) est utilisé comme marqueur des OPC et des pré-oligodendrocytes. L'identification de nombreuses sous-populations pose la question de l'unicité de la lignée oligodendrocytaire (Richardson *et al.* 2000).

Dans le cerveau adulte, la population de **cellules gliales NG2⁺** positives pour le PDGFR, est souvent considérée comme le pool d'**OPC adultes**. Ils sont répartis uniformément dans le SNC et représentent 5% du cerveau adulte. Ils établissent des contacts avec les neurones et les synapses et se comportent comme des précurseurs (Richardson *et al.* 2011). Le devenir de ces cellules est controversé. Il s'agirait d'un réservoir potentiel capable de générer des oligodendrocytes, des astrocytes mais aussi des neurones. La génération de nouveaux oligodendrocytes seraient impliqués dans les processus de réparation mais aussi dans les processus de plasticité neuronale dans un cerveau sain.

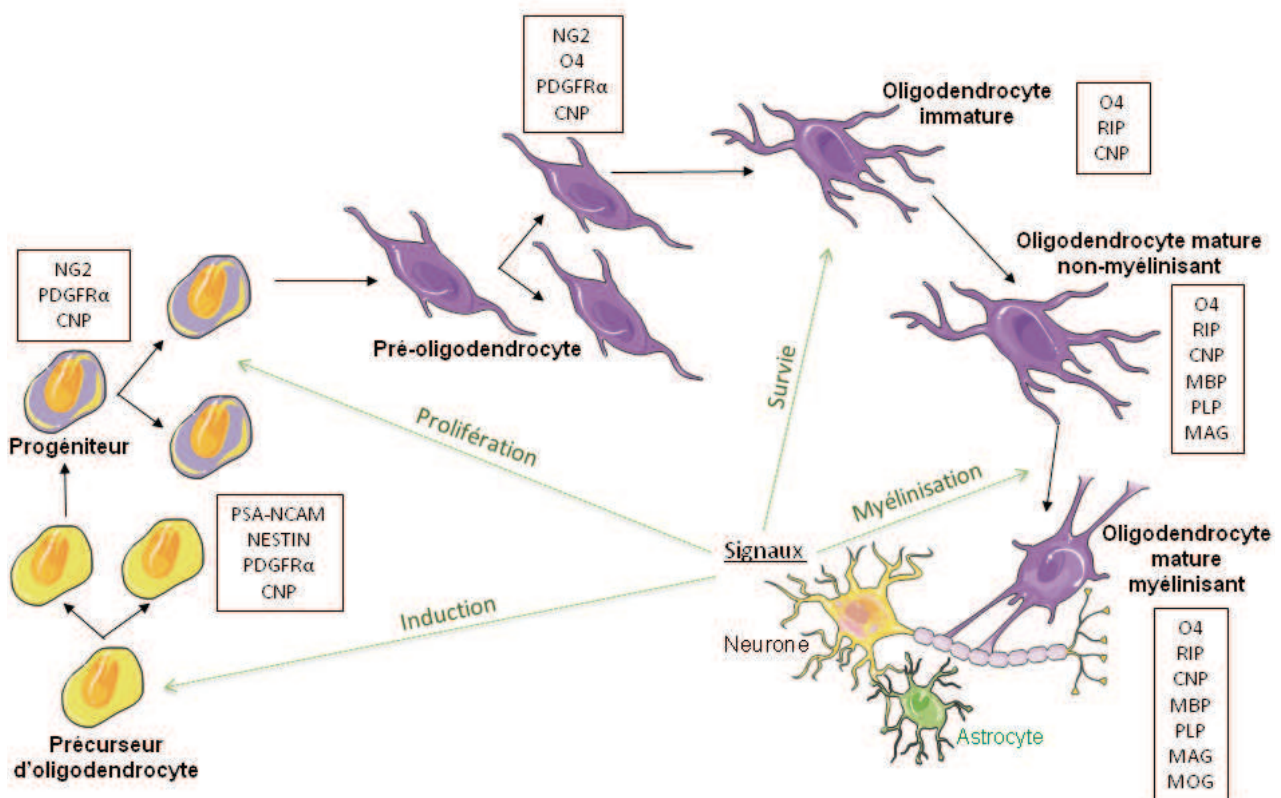


Figure 27 : Maturation et différenciation des oligodendrocytes. Les oligodendrocytes dérivent de cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPC). Les OPC se divisent puis maturent par étapes successives où ils acquièrent des marqueurs de maturation oligodendrocytaire (encadrés noirs). Les oligodendrocytes matures se différencient en cellules myélinisantes sur leur lieu de résidence. PSA-NCAM (Polysialylated neural cell adhesion molecule). (figure adaptée de Baumann & Pham-Dinh 2001)

b. Les astrocytes, les étoiles de la glie

Du rôle de soutien au véritable acteur de la transmission neuronale

Caractéristiques morphologiques et diversité des astrocytes

Les astrocytes doivent leur nom à leur morphologie étoilée (Fig. 28A). En effet, une cellule astrocytaire établit des centaines de milliers de contacts avec ses cellules voisines en relation avec sa diversité fonctionnelle. Des prolongements cytoplasmiques spécialisés, ou **pieds astrocytaires**, contactent d'une part les cellules endothéliales des capillaires sanguins, participant ainsi à la BHE (Alvarez *et al.* 2013). D'autre part, les ramifications astrocytaires contactent les neurones au niveau du corps cellulaire mais aussi des dendrites et des axones. Les astrocytes humains ont des petits corps cellulaires de 10 µm de diamètre mais leurs ramifications couvrent des territoires allant jusqu'à quelques centaines de micromètres (Nedergaard *et al.* 2003; Oberheim *et al.* 2006). L'observation du cytoplasme complet des astrocytes a révélé que leur morphologie n'était pas si étoilée qu'on le pensait. Au contraire, les astrocytes occupent des **territoires bien définis** et ne se mélangent que par l'extrémité de leurs prolongements (Halassa *et al.* 2007) (Fig. 28B).

Les astrocytes, cellules les plus abondantes du SNC humain présentent une large diversité fonctionnelle. En ce sens, leur densité et leur morphologie varient en fonction des régions du SNC (Matyash & Kettenmann 2010). Rio Hortega décrivait déjà des **astrocytes protoplasmiques** dans la SG et des **astrocytes fibreux** dans la SB. Aujourd'hui, la précision va jusqu'à distinguer des degrés de recouvrement neuronal différents déterminants dans les propriétés de transmission synaptique. Des populations astrocytaires aux fonctions spécialisées coexistent également. Citons, par exemple, la **glie de Bergmann** du cervelet ou les **cellules de Müller** de la rétine.

Parmi les molécules exprimées par les astrocytes, certaines servent à leur observation. **GFAP** (Glial fibrillary acidic protein), un filament intermédiaire du cytosquelette, est couramment utilisé pour identifier les astrocytes. Ce marqueur est à utiliser avec précaution car il n'est pas détectable dans tous les astrocytes et est exprimé par d'autres types cellulaires comme les cellules épendymaires. Les astrocytes expriment également des transporteurs spécifiques, des récepteurs métabotropiques et ionotropiques, et un répertoire d'enzymes qui leur permettent d'assurer leurs fonctions dans le support métabolique du neurone, le maintien de l'homéostasie extracellulaire et la modulation de la transmission synaptique. Certaines de ces molécules sont aussi utilisées comme marqueurs astrocytaires plus ou moins spécifiques : la **S100-β**, une protéine qui fixe les ions calcium, les transporteurs astrocytaires du glutamate **EAAT1** et **EAAT2** (Excitatory amino acid transporters) ou encore le canal potassique **Kir4.1** et l'Aquaporine 4 (**AQP4**). Les caractéristiques

structurales, biochimiques et physiques des astrocytes sont en lien avec leur diversité de fonctions impliquées dans la mise en place, le maintien et le fonctionnement du SNC décrites ci-dessous. Il n'est donc pas étonnant que les astrocytes soient impliqués dans de nombreuses pathologies du SNC (Sofroniew & Vinters 2010).

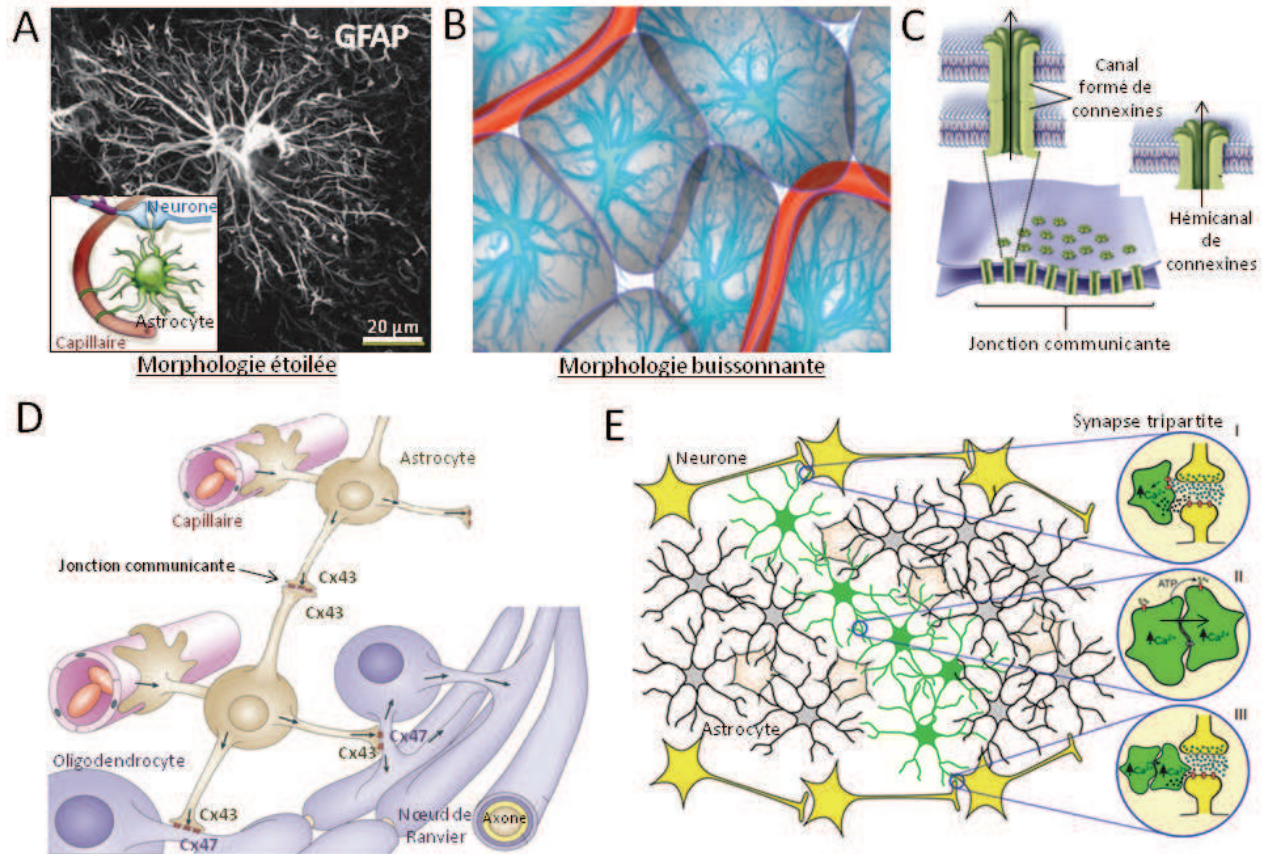


Figure 28 : Caractéristiques des astrocytes. **A.** Morphologie étoilée d'un astrocyte protoplasmique humain après un immuno-marquage anti-GFAP (image extraite de Bélanger & Magistretti 2009). **B.** Les astrocytes ont une morphologie plus buissonnante qu'étoilée. Ils occupent un territoire bien défini qui ne se mélange pas au territoire des astrocytes voisins. **C.** Les jonctions communicantes entre deux cellules gliales sont formées de deux connexons de 6 connexines. L'expression des différentes connexines est spécifique de chaque type cellulaire. **D.** Le réseau astrocytaire (adapté de Nave 2010). Les astrocytes expriment les connexines Cx43, Cx30 et Cx26. Ils forment un continuum de cytoplasmes. L'exemple des jonctions communicantes homotypiques et inter-astrocytaires Cx43/Cx43 est donné sur ce schéma. Les astrocytes communiquent avec les oligodendrocytes via des jonctions communicantes hétérotypiques, Cx43/Cx47 par exemple. Les oligodendrocytes expriment Cx47, Cx32 et Cx29. **E.** Le syncytium astrocytaire forme un réseau fonctionnel (adapté de Goubard 2010). Par exemple, l'augmentation de calcium astrocytaire résultant d'une activité synaptique peut se propager via les astrocytes jusqu'à une autre synapse d'un même réseau neuronal et nuancer l'activité de cette seconde synapse.

Enfin, les astrocytes sont couplés par des **jonctions communicantes** homotypiques (Fig. 28C), principalement composées des **connexines astrocytaires Cx43 et Cx30** et de **pannexines** (Altevogt & Paul 2004). Ils échangent par ce biais des informations et de petites molécules comme le glutamate, le glutathion ou l'ATP entre les cytoplasmes (Fig. 28C). Ils forment ainsi un **réseau intercellulaire**, qui fonctionne comme un véritable réseau fonctionnel et dynamique (Tabernero *et al.* 2006). De la même façon, les astrocytes sont couplés avec les autres cellules gliales, notamment

les oligodendrocytes par des jonctions communicantes hétérotypiques (Nave 2010) (Fig. 28D). Ce couplage est nécessaire pour le maintien des gaines de myéline et la survie des oligodendrocytes. L'expression, le recrutement à la membrane et la phosphorylation des différentes connexines sont liés entre elles. Il est intéressant de noter que les connexines, et les pannexines, peuvent également former des **hémi-canaux** libérant de petites molécules, comme l'ATP, dans l'espace extracellulaire (Giaume *et al.* 2013). Cette possibilité a modifié la vision traditionnelle de la fonction des connexines.

Dès leur origine, les astrocytes participent au développement du SNC

Les astrocytes contrôlent des étapes clés du développement du SNC (Chaboub & Deneen 2013). On parle alors de **glias radiaires**, qui sont les premières cellules de la lignée astrocytaire. Tout d'abord, elles inhibent ou favorisent la **prolifération des précurseurs neuronaux** en libérant des facteurs de croissance de type EGF (Epidermal growth factor) et des cytokines du type TNF- α (Tumor necrosis factor- α). Ensuite, elles guident la **migration des neuroblastes** vers leur destination finale en leur fournissant une sorte d'échafaudage cellulaire. Il s'agit d'un guidage mécanique mais aussi chimique en libérant des signaux de guidage et en modulant l'environnement métabolique. La glie radiaire disparaît finalement au profit des astrocytes adultes qui vont alors apporter un support trophique et physique à la **croissance axonale et dendritique** des neurones. Les astrocytes produisent en particulier les protéines de la matrice extracellulaire et d'adhésion nécessaires à la croissance des neurites vers les cellules cibles. Les astrocytes continuent ensuite d'interagir avec les neurones en aidant à la **synaptogénèse** notamment via les signaux décrit historiquement dans le guidage axonal (Eroglu & Barres 2010). Enfin, ils favorisent l'**angiogénèse** en sécrétant du VEGF (Vascular endothelial growth factor). En stade post-natal, ils participeront au **développement des oligodendrocytes** en sécrétant des facteurs de croissance type PDGF nécessaires à la survie des précurseurs oligodendrocytaires, puis à la myélinisation (Barnett & Linington 2012).

L'astrocyte, le meilleur ami du neurone

- **Astrocytes et métabolisme neuronal**

Les astrocytes gèrent le **métabolisme cellulaire** en fonction de l'activité neuronale. De par leur position stratégique sur les parois des capillaires sanguins, les pieds astrocytaires constituent une voie de passage du **glucose** de la circulation sanguine vers le neurone (Taberero *et al.* 2006; Alvarez *et al.* 2013). Les astrocytes stockent le glucose sanguin, via le transporteur GLUT1, sous forme de **glycogène**, la principale forme de réserve énergétique du SNC (Fig. 29, cycle violet). Lors de l'augmentation de l'activité neuronale, les astrocytes assurent l'apport en **lactate** du neurone, son

propre support énergétique, via les transporteurs MCT (Monocarboxylate transporter) (Magistretti & Pellerin 1999). En effet, en cas de transmission synaptique, la libération de glutamate ou d'autres neurotransmetteurs et l'augmentation de la concentration extracellulaire en K^+ sont captés par les astrocytes. Ces signaux stimulent la capture du glucose, la glycogénolyse et la glycolyse. L'ATP produit en conséquence alimente les pompes Na^+/K^+ ainsi que les autres enzymes nécessaires au recyclage de glutamate et à la production de lactate. Le lactate est converti en pyruvate puis en ATP par les neurones via le cycle de Krebs. Le lactate peut également servir à la synthèse d'acides aminés tels que les neurotransmetteurs dont le glutamate.

Les astrocytes réapprovisionnent non seulement les neurones en métabolites énergétiques mais régulent également le **débit sanguin** local (Takano *et al.* 2006). En effet, l'augmentation de l'activité cérébrale entraîne une augmentation du débit sanguin local fournissant l'énergie et l'oxygénation nécessaire et permettant d'éliminer les toxines issues du métabolisme. Ce phénomène, à la base des techniques d'IRM fonctionnelles, est médié par des vagues calciques astrocytaires entraînant la libération de facteurs vasodilatateurs.

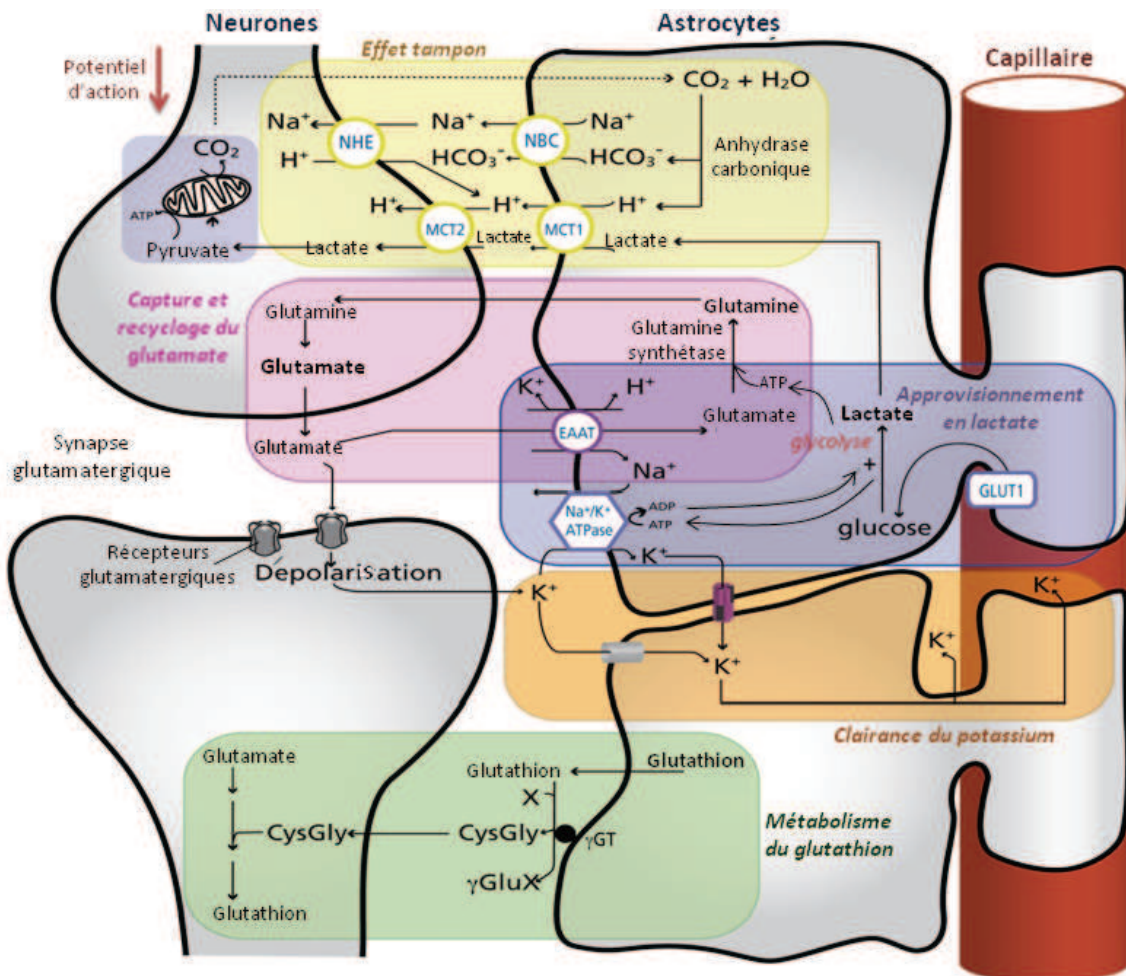


Figure 29 : Les interactions astrocytes-neurones (figure adaptée de Bélanger & Magistretti 2009). Exemple d'une synapse glutamatergique. NHE : Sodium-hydrogen exchange; NBC : $Na^+-HCO_3^-$ cotransporteur ; γ GT : γ -Glutamyl transpeptidase.

- **Astrocytes et homéostasie du SNC**

Les astrocytes sont indispensables au maintien de la stabilité du micro-environnement neuronal. Le SNC est préservé d'une part des fluctuations métaboliques du système circulatoire par la BHE et d'autre part des fluctuations locales dues à l'activité neuronale par les astrocytes. Ces derniers assurent notamment **la capture et l'inactivation des neurotransmetteurs** évitant ainsi l'activation de récepteurs extra-synaptiques (Fig. 29, cycle rose). Les astrocytes emmagasinent une grande partie du glutamate via les transporteurs EAAT 1 ou 2, respectivement appelés GLAST (Glutamate aspartate transporter) et GLT-1 (Glutamate transporter-1), puis le métabolisent en glutamine via la glutamine synthase (Danbolt 2001). Les neurones renouvellent leur stock de glutamate à partir de glutamine. Les astrocytes assurent également **l'homéostasie ionique**, notamment potassique, du milieu extracellulaire (Bélanger & Magistretti 2009). En effet, la dépolarisation neuronale entraîne une sortie extracellulaire massive d'ions K^+ par les canaux voltage-dépendant que les astrocytes récupèrent transitoirement par des canaux K^+ et des pompes Na^+/K^+ (Wallraff *et al.* 2006). Les ions K^+ sont redistribués dans le syncytium astrocytaire selon leur gradient de concentration et relargués dans le milieu extracellulaire. On parle de **clairance du K^+** (Fig. 29, cycle orange). Enfin, les astrocytes veillent au **maintien du pH extracellulaire** en contrebalançant les modifications acido-basiques liées à l'activité neuronale grâce à l'abondance de l'anhydrase carbonique (Bélanger & Magistretti 2009) (Fig. 29, cycle jaune).

- **Astrocytes et modulation de l'activité neuronale**

Le concept de **synapse tripartite** est aujourd'hui bien accepté (Goubard 2010). Les astrocytes sont des cellules hyper-polarisées (entre -80 et -90 mV) qui présentent une relation courant/voltage linéaire. Ils sont donc incapables d'émettre des potentiels d'action et pourtant, participent à la transmission du message nerveux. Suite à l'activité neuronale, une augmentation de la concentration calcique astrocytaire conduit à la libération de **gliotransmetteurs** par les astrocytes modulant en retour la transmission synaptique via les récepteurs neuronaux pré- ou post-synaptiques. Il peut s'agir de glutamate, d'ATP, de la D-sérine, un agoniste des récepteurs NMDA (N-méthyle-D-aspartate), du GABA (Acide gamma-aminobutyrique) ou de molécules vaso-actives comme l'acide arachidonique ou la prostaglandine E2 (Ben Achour & Pascual 2012). La voie de libération des gliotransmetteurs est débattue (Hamilton & Attwell 2010). Ils pourraient être libérés par exocytose ou par des mécanismes non-vésiculaires incluant le fonctionnement inversé des transporteurs de glutamate, les héli-canaux ou les récepteurs purinergiques P2X7. De façon intéressante, l'activité synaptique d'un neurone peut entraîner la propagation d'une vague calcique chez les astrocytes voisins conduisant à la modulation de cette synapse mais aussi de synapses plus

ou moins éloignées (Hirase *et al.* 2004) (Fig. 28E). Les conséquences fonctionnelles de la gliotransmission sont donc nombreuses sur l'activité cérébrale comme la mémoire, l'apprentissage ou encore le sommeil (Ben Achour & Pascual 2012).

Les astrocytes en conditions pathologiques

Astrogliose et cicatrice astrocytaire

Les astrocytes deviennent **réactifs** en cas de signal de danger (Fig. 30). Ils sont caractérisés par une hypertrophie cellulaire, due à l'accumulation de glycogène, et des changements moléculaires propres aux différentes conditions pathologiques comme nous le verrons dans la SEP (Sofroniew 2005; Lundgaard *et al.* 2014). L'accumulation de filaments intermédiaires, ou fibrose, est observée par l'augmentation du marquage GFAP. La réaction astrocytaire est parfois accompagnée de leur prolifération. On ne connaît pas tout à fait dans quelles mesures ces changements affectent les fonctions habituelles des astrocytes ou si ils leur confèrent de nouvelles fonctions. Les astrocytes semblent être impliqués dans les processus de réparation cellulaire mais aussi être responsables d'effets toxiques pour les neurones environnant : favorisation de l'inflammation, libération de substances toxiques et formation de cicatrice empêchant la repousse axonale.

La formation de la **cicatrice gliale** présente ce double aspect (Fig. 30A). L'ablation spécifique des astrocytes réactifs dans des modèles animaux a montré une perturbation de la régulation spatio-temporelle de l'inflammation (Faulkner *et al.* 2004). En effet, la cicatrice gliale permet de **confiner l'inflammation** sur le site lésionnel, qui est ensuite facilement résorbée en absence de pathologie chronique. Ces mêmes animaux déplétés en astrocytes réactifs présentent de l'œdème tissulaire et une dilatation anormale des capillaires (Bush *et al.* 1999). Les astrocytes participent donc également à la **résorption de l'œdème interstitiel** et à la **réparation de la BHE endommagée** (Takano *et al.* 2006). Les techniques de diffusion apparente permettent de suivre l'eau en mouvement lors d'une rupture de la BHE. Pendant la phase de résolution, l'augmentation de l'expression de l'AQP4 sur les astrocytes permettrait de réabsorber l'eau entrée. Enfin, les animaux déplétés sont aussi touchés par une aggravation de la dégénérescence secondaire à l'atteinte du SNC attribuée aux pertes de fonctions astrocytaires. L'accumulation extracellulaire de glutamate affecterait alors les neurones et les oligodendrocytes sensibles à son excitotoxicité, augmentant la dégénérescence neuronale (Bush *et al.* 1999; Faulkner *et al.* 2004). Paradoxalement, les astrocytes réactifs sécrètent des **substances cytotoxiques pour les neurones** et les autres cellules gliales comme les radicaux d'oxyde nitrique (NO) et les espèces réactives de l'oxygène (ROS) (Hamby & Sofroniew 2010). De même, ils semblent **empêcher la régénérescence axonale**

en sécrétant des facteurs inhibiteurs de migration comme les éphrines ou des protéoglycanes (Silver & Miller 2004). Connaissant le rôle développemental des astrocytes dans le guidage axonal, il serait intéressant de comprendre la signalisation qui donne ce phénotype inhibiteur aux astrocytes réactifs.

Les astrocytes réactifs sont hétérogènes en fonction de leur distance au site lésionnel, de leur environnement cellulaire et de la région anatomique du SNC. Il en résulte une dynamique différente des signaux activateurs et de sortie des astrocytes (Zong *et al.* 2005; Wanner *et al.* 2013) (Fig. 30B). Il ne serait pas étonnant que les altérations des voies de signalisation astrocytaires en réponse à des *stimuli* pathologiques puissent être à l'origine, ou du moins participer à des dysfonctionnements gliaux et/ou neuronaux (Bélanger & Magistretti 2009; Sofroniew & Vinters 2010; Hamby *et al.* 2012). Par exemple, le TGF- β couplé à des facteurs pro-inflammatoires type LPS ou IFN- γ , induit l'expression de l'enzyme de synthèse du NO (iNOS) par les astrocytes (Hamby & Sofroniew 2010). De même, la perturbation de l'expression des connexines modifie le réseau astrocytaire et son fonctionnement nécessaire à la régulation synaptique et oligodendrocytaire.

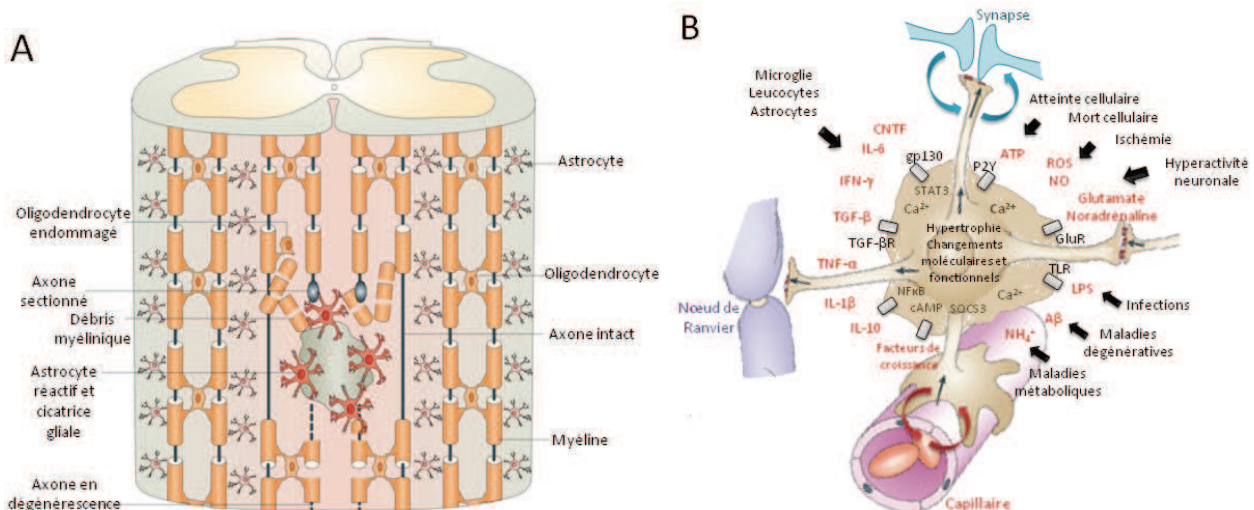


Figure 30 : Les astrocytes en conditions pathologiques. A. La cicatrice astrocytaire suite à une lésion de la moelle épinière (figure adaptée de Yiu & He 2006). B. Complexité des signaux régulant la réaction astrocytaire (figure adaptée de Sofroniew & Vinters 2010).

Les fonctions immunes de l'astrocyte

Si l'attention s'est focalisée sur les cellules microgliales, des observations récentes suggèrent que les astrocytes ont aussi leur place dans la régulation des mécanismes immunitaires locaux et donc dans la **neuroinflammation** (Dong & Benveniste 2001; Farina *et al.* 2007). Au sein même de la cicatrice gliale mais pas seulement, les astrocytes exercent des fonctions pro- et anti-inflammatoires afin de confiner puis résorber la réaction inflammatoire.

Les astrocytes participent au déclenchement de la réponse immunitaire via l'expression des récepteurs PRR (Pattern recognition receptor) de l'immunité innée spécialisés dans la **reconnaissance des signaux de danger**. Ils alertent le système immunitaire de la présence d'un

pathogène ou d'un dysfonctionnement cérébral parfois indépendant d'un contexte infectieux. Parmi ces récepteurs, les récepteurs Toll-like (TLR) sont les plus connus. Les astrocytes expriment majoritairement, au niveau basal, le **TLR3**, comme il l'a été montré sur des astrocytes humains fœtaux (Farina *et al.* 2005). Son expression est renforcée sous l'effet de cytokines pro-inflammatoires. Le ligand habituel du TLR3 est l'ARN double-brin viral mais il pourrait également reconnaître des ARN messagers de cellules nécrotiques dans un contexte de neuro-dégénérescence. L'expression des autres TLR a également été décrite *in vitro* mais seule l'expression du TLR3 conduit à l'induction de nouveaux signaux inflammatoires, comme des cytokines, la production de iNOS et de NO (Farina *et al.* 2005). L'activation du TLR3 entraîne également la diminution de l'expression de la connexine 43, ce qui perturbe la formation des jonctions communicantes (Zhao *et al.* 2006) et la diminution de la capture du glutamate (Farina *et al.* 2007). Outre les TLR, les astrocytes expriment d'autres récepteurs PRR comme les protéines kinases dépendantes des ARN double-brin (PKR), les protéines NOD (Nucleotide-binding oligomerization domain), les récepteurs du mannose (MR) et les récepteurs « scavenger » ou éboueurs (SR) (Farina *et al.* 2007). Leur activation initie des voies de signalisation astrocytaires comme la synthèse de cytokines ou la production de métalloprotéines. Enfin, les astrocytes expriment des constituants du système du complément, pour tuer des pathogènes et en sont protégés en exprimant des inhibiteurs du complément (Gasque *et al.* 2000).

Une fois activés, les astrocytes sécrètent des **cytokines**. Ces **médiateurs de l'inflammation** activent d'une part les cellules voisines et donc amplifient la réponse immunitaire innée locale, et d'autre part, modifient la perméabilité de la BHE, modulant ainsi l'entrée et la migration des cellules immunitaires sanguines et amplifiant la réponse immunitaire adaptative (John *et al.* 2003; Farina *et al.* 2007). Ces cytokines ont une action directe sur les astrocytes modifiant leur capacité de migration, de prolifération et de survie. TNF- α , IFN- γ et IL-1 sont les principaux activateurs astrocytaires. Ils modifient l'expression de nombreuses fonctions cellulaires comme la présentation antigénique, le chimiotactisme ou l'apoptose. Autres exemples, CXCL12 et CCL5 induisent le relargage de glutamate par les astrocytes et la production de nouvelles cytokines (Ambrosini & Aloisi 2004). GM-CSF (Granulocyte-macrophage colony-stimulating factor), IL-6, CCL2 and CCL5 agissent en particulier sur les cellules microgliales en modifiant leur état d'activation, leur migration et prolifération. CCL2, CCL5, CXCL10, CXCL12 et BAFF (B cell activating factor of the TNF family) agissent également sur le recrutement et l'activation des lymphocytes infiltrants.

Les astrocytes sécrètent aussi des **facteurs anti-inflammatoires et neuro-protecteurs**, incluant des facteurs de croissance comme le GM-CSF ou l'IGF-1 (Insulin growth factor), le VEGF, les neurotrophines et le CNTF (Ciliary neurotrophic factor). L'activation du TLR3, par exemple, peut conduire à la production de NO cytotoxique, comme ci-dessus, ou bien à des voies de

réparation tissulaire (Bsibsi *et al.* 2006). La délétion du gène STAT3 chez des modèles murins, qui permet de réduire la réaction astrocytaire suite à une lésion et donc d'étudier ses fonctions, conduit à une diminution de la production de CNTF et de l'IL-6 à tendance anti-inflammatoire (Sofroniew 2005). En contrepartie, l'inflammation s'amplifie mais la récupération motrice est moindre (Faulkner *et al.* 2004). Les cytokines comme IL-6 et même IL-1 β ou TNF- α ont des actions ambivalentes. Elles sont impliquées dans les réponses pro-inflammatoires mais aussi dans l'induction de la production de facteurs neurotrophiques comme IGF-1 et CNTF (Mason *et al.* 2001; Liberto *et al.* 2004). De même, CCL2 et CXCL12, produites par les astrocytes, favoriseraient le recrutement de progéniteurs neuraux dans les zones de lésions (Belmadani *et al.* 2009). La balance entre les signaux pro- et anti-inflammatoires est fondamentale pour contrôler la réaction inflammatoire suite à une lésion du SNC. Son dysfonctionnement est à l'origine de la neuroinflammation chronique. Les astrocytes en sont alors très vite affectés. Néanmoins, ils sont résistants à l'apoptose induite par les récepteurs de mort ce qui leur permet de survivre à des attaques inflammatoires.

2) Les milles facettes des cellules microgliales et des macrophages

a. Les cellules microgliales, les macrophages spécialisés du SNC

Les monocytes circulants, les macrophages tissulaires et les cellules microgliales

Les cellules microgliales, comme les autres macrophages tissulaires répartis dans le corps humain, sont spécialisés dans la surveillance immunitaire. Ils sont là pour détecter l'invasion de pathogènes et les signaux de danger puis stimuler les autres cellules immunitaires. La plupart des tissus, en particulier proches des surfaces d'échange, comme la peau, le foie, les poumons... sont envahis dès leur formation par des **macrophages résidents** : les macrophages alvéolaires des poumons, les cellules de Kupffer du foie, les ostéoclastes des os... (Fig. 31A). Ces macrophages constituent la première ligne de défense d'un tissu. En cas de signal inflammatoire, des précurseurs macrophagiques, les **monocytes circulants**, sont recrutés de la périphérie vers le tissu endommagé. Ils se différencient alors en macrophages et apportent leur soutien à la réponse immunitaire mise en place. Il devient alors difficile de les distinguer des macrophages résidents. Il en est de même pour les **cellules microgliales**, les macrophages spécialisés du SNC, qui, en cas d'inflammation, sont

difficilement distinguables des macrophages infiltrants. Les macrophages tissulaires participent également au maintien de l'homéostasie tissulaire en évacuant les débris de cellules mortes et les produits toxiques.

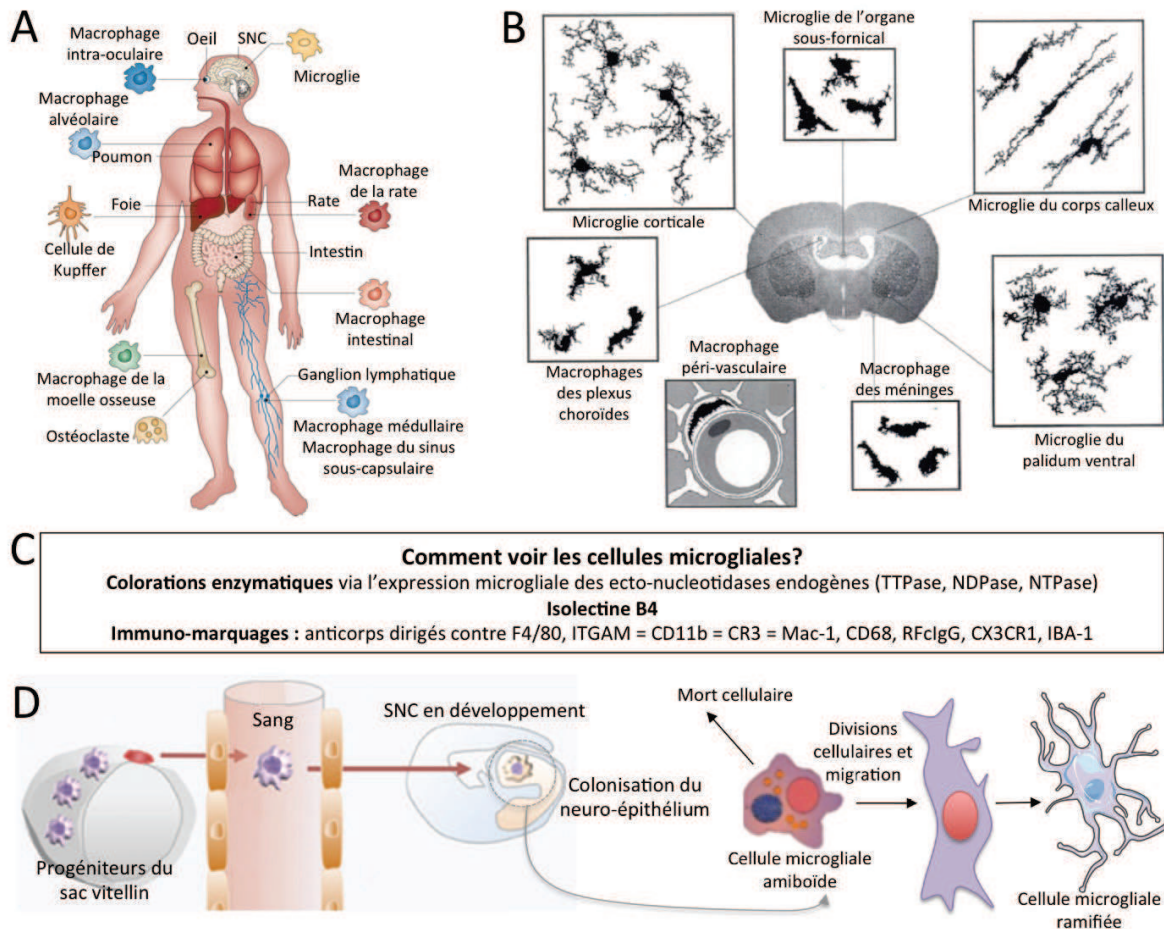


Figure 31 : Les cellules microgliales et les macrophages du SNC. **A.** Diversité des macrophages tissulaires (adaptée de Murray & Wynn 2012). **B.** Hétérogénéité des populations de cellules microgliales et de macrophages du SNC (images extraites de Perry *et al.* 1994). **C.** Comment observer les cellules microgliales ? TTPase : Thiamine triphosphatase ; NDPase : Nucleoside diphosphatase ; NTPase : Nucleoside triphosphatase ; ITGAM : Intégrin α M ; RFcIgG : Récepteur au fragment constant Fc des immunoglobulines G. **D.** Origine embryonnaire des cellules microgliales et changements morphologiques au cours du développement.

Approchons-nous des cellules microgliales

Les cellules microgliales, troisième type de cellules gliales que nous évoquons, représentent 5 à 20% des cellules du SNC (Ransohoff & Cardona 2010). Elles sont considérées comme les **cellules immunitaires**, par excellence, du SNC, mais déjà, en conditions physiologiques, elles remplissent des fonctions primordiales que nous détaillerons ci-dessous. Au cours du développement, elles régulent la neurogénèse et la synaptogénèse (Bessis *et al.* 2007). A l'âge adulte, elles explorent en permanence le tissu nerveux afin de détecter toute entrée de pathogènes ou dysfonctionnement cellulaire et elles nettoient le tissu en phagocytant les débris cellulaires (Nimmerjahn *et al.* 2005).

Le terme de **microglie** a été introduit pour la première fois par Rio Hortega au début du siècle (1919). Il n'introduisait alors pas seulement une nouvelle description cellulaire mais un réel concept aussi bien ontogénique que fonctionnel. En effet, il suspectait déjà une origine extrinsèque au SNC. Jusqu'aux années 1990, des progéniteurs extérieurs, d'origine mésodermique, envahissaient le SNC et se différenciaient en cellules ramifiées quiescentes. Très rapidement, la microglie ramifiée est observée lors de ces changements morphologiques suite à une lésion. Une simple aiguille introduite dans le parenchyme cérébral provoque un changement morphologique des cellules microgliales vers une **forme amiboïde**, associé à une motilité accrue, une capacité proliférative et une activité phagocytaire.

De la simple coloration enzymatique sur coupe de tissu à l'immuno-marquage fluorescent, les observations des cellules microgliales se multiplient aujourd'hui. Cependant, un problème majeur persiste. Quel que soit le type de marquage utilisé, différentes populations cellulaires sont mises en évidence, incluant non seulement les **cellules microgliales du parenchyme cérébral** mais également les **macrophages péri-vasculaires**, les **macrophages méningés** et les **macrophages des plexus choroïdes** (Fig. 31B) (Perry *et al.* 1985; Lawson *et al.* 1990). Néanmoins, et du moins en situation physiologique, ces observations ont permis de distinguer une grande hétérogénéité morphologique des cellules microgliales. Répartie de façon homogène dans le parenchyme, la population microgliale majoritaire est fortement ramifiée. Chaque cellule occupe un territoire différent. D'autres populations microgliales présentent une forme plus gonflée (Fig. 31B). A la différence des macrophages périvasculaires, les cellules microgliales établissent de véritables contacts physiques avec les neurones et les astrocytes.

Aujourd'hui, les cellules microgliales sont communément observées après un marquage dirigé contre **IBA-1** (Ionized calcium binding adaptater molecule) de la famille de AIF-1 (Cytokine-responsive macrophage molecule) (Fig. 31C). IBA-1 est constitutivement exprimé par les cellules microgliales et son niveau d'expression augmente en cas de réaction inflammatoire, traumatique ou ischémique (Postler *et al.* 2000; Mittelbronn *et al.* 2001). **CD68**, de la famille des protéines LAMP (Lysosomal-associated membrane glycoprotein) jouant un rôle dans le transport vésiculaire jusqu'au lysosome, est souvent utilisé pour marquer les cellules microgliales activées. En réalité, ce marqueur est aussi exprimé à l'état basal des cellules. **GLUT5** serait un bon marqueur pour distinguer les cellules microgliales activées des macrophages dérivés des monocytes (Stoll *et al.* 2006). Mais, GLUT5 est retrouvé à la fois sur la microglie quiescente et activée. En effet, un bon marqueur permettant de distinguer la microglie quiescente de celle activée n'est pas communément admis. En conséquence, l'étude des processus pathologiques impliquant l'activation microgliale se fait principalement en étudiant les changements morphologiques, le taux de prolifération et l'expression d'autres molécules immunitaires plus ou moins connues.

L'origine des cellules microgliales et des macrophages

Les macrophages infiltrants se différencient à partir des monocytes circulants eux-mêmes issus des précurseurs myéloïdes communs générés dans la moelle osseuse tout au long de la vie (Fig. 12). Si les cellules microgliales ont très vite été considérées comme un composant cellulaire du SNC depuis leur découverte, il a fallu également prouver leur appartenance au lignage myéloïde (Ransohoff & Cardona 2010). Cette population cellulaire, de part ces analogies de fonction avec les macrophages tissulaires, a longtemps laissé penser qu'elle se renouvelait continuellement. Chez la souris, des expériences de greffe de moelle osseuse GFP⁺ avaient montré la différenciation en microglie de cellules GFP⁺ au sein du SNC, suggérant l'entrée régulière de précurseurs sanguins participant au renouvellement microglial (Priller *et al.* 2001). Ces études ont été fortement contestées proposant que l'irradiation des souris préalables aux greffes induisait une ouverture la BHE favorisant ainsi le passage de précurseurs myéloïdes (Mildner *et al.* 2007). Le débat s'est restreint récemment lorsqu'une équipe a démontré l'origine extra-embryonnaire et mésodermique des cellules microgliales adultes (Fig. 31D) (Ginhoux *et al.* 2010; Kierdorf *et al.* 2013). Les cellules microgliales trouveraient en fait leur origine dans des **progéniteurs des sacs vitellins**, les progéniteurs erythromyéloïdes (Fig. 12). Ces progéniteurs envahiraient le tube neural après quelques jours de développement embryonnaire avant même l'envahissement vasculaire. Leur migration via des récepteurs de chimiokines et la production de métalloprotéinases puis leur prolifération au sein du parenchyme cérébral, sous une forme amiboïde, précéderait leur différenciation en cellules microgliales ramifiées, comme on les observe à l'âge adulte (Fig. 31D) (Arnoux *et al.* 2013). Il s'agit donc de la progression inverse de l'activation microgliale, au cours de laquelle les cellules s'hypertrophient (Fig. 32C). L'expression des facteurs de transcription **PU-1** et **IRF-8** (Interferon regulatory factor) est essentielle pour la différenciation microgliale (Schulz *et al.* 2012). Le **récepteur au CSF-1** serait le chef d'orchestre de cette différenciation. Ses ligands, le CSF-1 et l'IL-34, potentiellement produits par les neurones et les cellules gliales en développement, stimuleraient la croissance des ramifications microgliales tout en favorisant la division cellulaire et en inhibant l'apoptose (Lin *et al.* 2008). Ainsi, le stock des cellules microgliales est établi à l'âge adulte et le taux de prolifération reste très faible en situation non-pathologique. Les cellules microgliales sont donc issues de progéniteurs extérieurs, d'origine mésodermique, qui se sont installés définitivement dans le SNC (Prinz *et al.* 2011; Schulz *et al.* 2012; Prinz & Priller 2014).

L'activation microgliale et macrophagique

L'**activation des cellules microgliales** est associée à la quasi-totalité des conditions pathologiques du SNC. Les cellules microgliales sont activées par de nombreux signaux. Il peut

s'agir de **cytokines**, de **facteurs du complément**, de **protéines plasmatiques** qui ne franchissent normalement pas la BHE comme l'albumine ou la thrombine ou de **molécules pathogènes** comme des composants bactériens ou viraux reconnus par les récepteurs PRR exprimés par les cellules microgliales (Colton & Wilcock 2010). Les **neurones endommagés** libèrent des signaux de danger également capables d'activer les cellules microgliales comme l'ATP. La présentation côté extracellulaire de la phosphatidylsérine sur la membrane d'un neurone abimé est aussi un signal activateur pour qu'il soit phagocyté. Une fois activées, les cellules microgliales sont impliquées dans l'**amplification de la réaction inflammatoire**, dans la **dégénérescence neuronale** mais aussi dans les processus de **réparation tissulaire** (González-Scarano & Baltuch 1999).

Le terme d'activation microgliale désigne l'ensemble des changements qui affectent une **cellule microgliale ramifiée quiescente** (Fig. 32C). Le qualificatif « quiescent » est resté aujourd'hui pour désigner les cellules microgliales non activées, simples sentinelles décrites par Rio Hortega. Cependant, il faut bien avoir conscience qu'elles ne sont en aucun cas inertes, mais bien en train de scanner continuellement leur environnement (Davalos *et al.* 2005). Le volume total du cerveau est scanné toutes les quatre heures environ (Nimmerjahn *et al.* 2005). En conditions physiologiques, des systèmes moléculaires maintiennent les cellules microgliales à l'état non activé, prévenant ainsi toute réaction inflammatoire précoce (Fig. 32A) (Ransohoff & Cardona 2010). En cas d'activation, les changements les plus visibles sont morphologiques. Le modèle le plus simple de l'activation microgliale est d'induire une lésion avec un laser dans un tissu cérébral (Fig. 32B). On observe alors le **réarrangement immédiat des prolongements microgliaux** vers la région lésée ainsi confinée (Davalos *et al.* 2005). C'est l'ATP libéré par les neurones endommagés qui, reconnu par les récepteurs métabotropiques P2Y₁₂, attire les cellules microgliales. *In vitro*, l'activation microgliale est induite par du lipopolysaccharide (LPS). Le LPS stimule le TLR4 et entraîne l'**hypertrophie cellulaire caractéristique de l'activation microgliale** (Zielasek & Hartung 1996). On suppose que c'est de nouveau l'ATP qui entraîne cette fois la rétraction des prolongements microgliaux via les récepteurs d'adénosine (Orr *et al.* 2009). Les cellules microgliales ramifiées s'arrondissent, elles sont dites **amiboïdes** (Fig. 32C). Dans les pathologies chroniques, l'activation microgliale est alimentée par les macrophages péri-vasculaires et l'invasion de monocytes circulants se différenciant en macrophages (Mildner *et al.* 2007). Il devient alors difficile de différencier les trois types cellulaires activés et la compréhension des mécanismes se complexifie (Fig. 32C) (Colton & Wilcock 2010).

La **prolifération** des cellules microgliales, le **changement de leur motilité** et de nombreux **changements moléculaires** sont associés aux **changements morphologiques**. Comme nous le verrons par la suite, suivant le contexte pathologique, suivant le stade de la maladie ou suivant la localisation de la lésion, les cellules microgliales et les macrophages activés ne présentent pas le

même phénotype. Avant, on parlait de **gliose réactionnelle** pour désigner l'activation microgliale en réponse à une attaque du SNC. Cette notion passive n'est plus d'actualité tant la **plasticité de l'activation microgliale** est importante. Des cellules microgliales activées voient leurs fonctions les plus connues augmentées mais d'autres inhibées ce qui crée l'ambiguïté lexicale du terme « activation ».

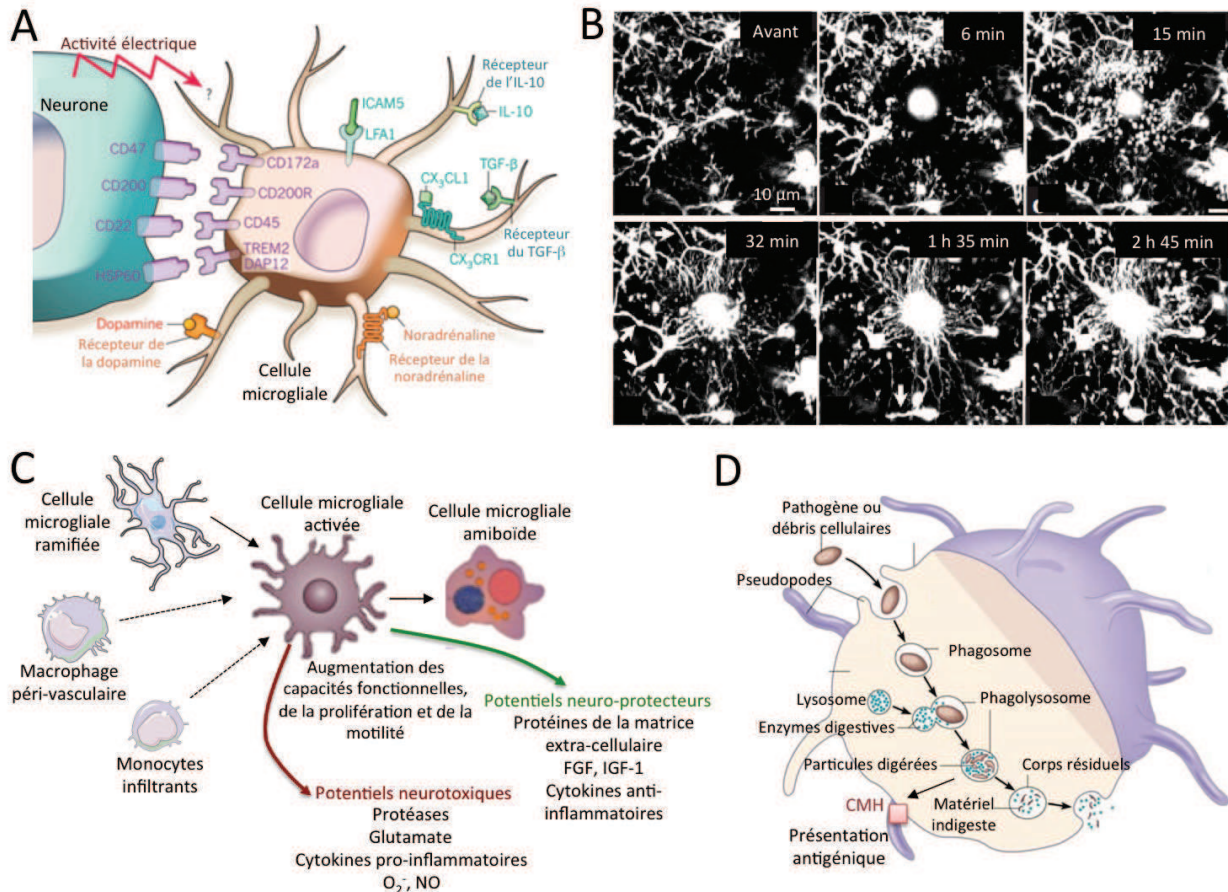


Figure 32 : L'activation des cellules microgliales. A. Maintien de l'état non activé des cellules microgliales (extrait de Ransohoff & Cardona 2010). B. Observation des cellules microgliales murines au microscope bi-photonique : changements morphologiques au cours de leur activation suite à une lésion corticale induite par un laser (extrait de Davalos *et al.* 2005). C. Représentation schématique de l'activation microgliale. Les cellules « quiescentes » ramifiées acquièrent une morphologie amiboïde. D. La phagocytose par les cellules microgliales activées.

Un rôle décisif dans le développement

La première grande intervention de la cellule microgliale est son implication au cours du développement, en particulier lors des **événements régressifs de la neurogénèse**. On assiste à un véritable génocide des neurones lors du modelage du SNC : la moitié des neurones générés disparaissent au cours du développement. Ce **remodelage par mort cellulaire** participe à l'ajustement des connections neuronales. La mort cellulaire n'est pas seulement due à un défaut de facteurs trophiques des cellules cibles mais aussi à des mécanismes actifs de mort cellulaire. Les **corps apoptotiques** sont ensuite éliminés par **phagocytose** avant même des processus de nécrose

secondaire qui pourraient être à l'origine de maladie auto-immunitaire. L'activité microgliale est alors très intense puisque la microglie ne représente à ce moment-là que 10% des cellules du SNC. Les cellules apoptotiques émettent des signaux qui attirent les cellules microgliales par **chimiostaxisme** comme l'ATP ou l'UTP (Uracyle triphosphate). La présentation de la phosphatidylsérine extracellulaire et la rupture des signaux inhibiteurs des neurones vers les phagocytes du type CD31 ou CD47 induisent la phagocytose. Les cellules vivantes continuent d'exprimer CD31 et CD47 et d'inhiber les phagocytes. Les débris apoptotiques sont phagocytés puis digérés par explosion respiratoire, c'est-à-dire par la production d'ions superoxyde lysosomaux (Théry *et al.* 1991). Il a été montré que les cellules microgliales ne phagocytent pas seulement des cellules en train de mourir mais bien des cellules vivantes (Mallat *et al.* 2005). Les cellules microgliales mettent ensuite en place une **réponse anti-inflammatoire** par la production d'IL-10 et de TGF- β .

Plus tard, les cellules microgliales joueraient aussi un rôle dans la **synaptogénèse** jusqu'à l'adolescence comme cela a été montré dans l'hippocampe et la rétine (Wake *et al.* 2009; Tremblay *et al.* 2010). Attirées par la fractalkine, les cellules microgliales sont recrutées au niveau des synapses en formation (Paolicelli *et al.* 2011; Hoshiko *et al.* 2012). Les synapses à phagocyter fixeraient le fragment iC3b du système du complément reconnu par le récepteur CD11b des cellules microgliales (Stephan *et al.* 2012). Une baisse de l'activité neuronale serait responsable de la levée de l'inhibition du système du complément par le neurone devenant alors vulnérable à la phagocytose.

La présence de cellules microgliales a été récemment montrée autour des corps cellulaires neuronaux vivants suggérant un lien avec l'**activité neuronale** (Li *et al.* 2012). De même, les cellules microgliales sécrètent des facteurs neurotrophiques participant à la **survie neuronale** (Ueno *et al.* 2013). Elles pourraient même favoriser la **neurogénèse** via la sécrétion de trypsinogène (Nikolakopoulou *et al.* 2013). Enfin, les cellules microgliales joueraient un rôle dans la **mise en place du réseau vasculaire** (Fantin *et al.* 2010). Des mutations génétiques comme dans le syndrome de Rett ou un stress périnatal à l'origine d'une activation anormale des cellules microgliales au cours du développement perturberaient donc leurs fonctions primordiales dans la mise en place du SNC. Des anomalies de la connectivité neuronale expliqueraient alors des retards mentaux.

Plus que des veilleurs du système immunitaire

Les cellules microgliales sont historiquement connues pour leur **rôle structural** et la **phagocytose des débris cellulaires**. Aujourd'hui, on sait que la microglie est le **chef de file du SI** dans le SNC. En effet, les cellules microgliales répondent à une atteinte du SNC en déployant tout

un panel de fonctions qui dépassent l'imagination. Comme nous l'avons décrit précédemment pour les astrocytes, les cellules microgliales sont connues pour exercer à la fois des fonctions pro-inflammatoires mais aussi anti-inflammatoires, ayant des **conséquences neurotoxiques ou neuroprotectrices** (Fig. 32C) (Nakajimi & Kohsaka 2001; Ransohoff & Perry 2009).

La régulation de l'activation microgliale

Le premier système d'activation des cellules microgliales est la **levée de l'inhibition permanente exercée par les neurones** et les autres cellules gliales (Fig. 32A) (Ransohoff & Cardona 2010). Ce signal inhibiteur est contenu dans les facteurs solubles du liquide interstitiel et dans les interactions cellule-microglie. Dans un cerveau sain, le TGF- β , la fractalkine et la prostaglandine E₂ participent à l'inhibition des cellules microgliales. Tout changement du milieu cytokinique est susceptible d'activer la microglie, en particulier, la présence du M-CSF (macrophage colony-stimulating factor-1) connue pour son action sur la survie, la prolifération et la différenciation des macrophages (Wegiel *et al.* 1998). L'état d'activation des cellules microgliales est déterminé par la quantité d'immuno-récepteurs inhibiteurs ou activateurs liés (Ransohoff & Perry 2009). Les récepteurs portant des motifs ITAM (Immunoreceptor tyrosine-based activation motifs) intracellulaires sont phosphorylés par les protéines kinases de la famille des Src, débutant une cascade d'activation intracellulaire. Au contraire, les récepteurs portant des motifs ITIM (Immunoreceptor tyrosine-based inhibition motifs) sont phosphorylés mais recrutent des phosphatases, atténuant la cascade d'activation. C'est le cas des récepteurs CD200R et CD172a exprimés par les cellules microgliales. De même, le récepteur TREM2 (Triggering receptor expressed on myeloid cells 2) inhibe la synthèse de cytokines pro-inflammatoires mais son expression est nécessaire pour la phagocytose des débris apoptotiques (Takahashi *et al.* 2007; Piccio *et al.* 2007). Son ligand serait une protéine de choc thermique HSP60 exprimée par les neurones.

Le deuxième type de signaux est la **reconnaissance de pathogènes étrangers** ou de **signaux de danger** dus à une atteinte tissulaire (Nakamura 2002; Ransohoff & Perry 2009). Les deux sortes de stimuli peuvent activer les **récepteurs de l'immunité innée** portés par les cellules microgliales. Les **PRR** regroupent les **TLR**, les **SR** et les protéines **NOD** que nous avons cités dans la partie sur les astrocytes. Tous les TLR, TLR1 à TLR9, sont exprimés par les cellules microgliales. Elles sont donc capables de reconnaître la plupart des pathogènes (Nguyen *et al.* 2002). En particulier, l'activation du TLR4 a été davantage étudiée puisque le LPS, un de ses ligands est utilisé pour activer *in vitro* les cellules microgliales (Olson & Miller 2004). Un contexte inflammatoire augmente l'expression des TLR, en particulier le TLR4 et le TLR2. Les signaux de danger sont aussi très variés. La **rupture**, ou l'**activation, de la BHE** est un signal décisif. Des protéines plasmatiques peuvent activer la microglie. Par exemple, le fibrinogène engage l'intégrine

microgliale CD11b (Davalos *et al.* 2012). D'autre part, les cellules microgliales sont sensibles aux **variations de neurotransmetteurs** (Hanisch & Kettenmann 2007). Entre autres, elles sont activées par un excès de glutamate via leurs récepteurs métabotropiques au glutamate ou par un excès d'ATP via leurs récepteurs ionotropiques P2X et métabotropiques P2Y. L'ATP est aussi relargué par des neurones endommagés. Les récepteurs P2X et P2Y fonctionnent alors comme des PRR du SNC. La perte de l'activité neuronale pourrait aussi activer la microglie (Ransohoff & Perry 2009).

Les fonctions principales des cellules microgliales

A l'état basal, ou « état de veille », la fonction des cellules microgliales est encore peu connue mais on sait qu'elles sont nécessaires à l'**homéostasie du SNC sain**. En effet, des anomalies génétiques sont à l'origine de pathologies du SNC. Par exemple, la mutation de TREM2 provoque des leuco-encéphalopathies. En outre, on suppose depuis peu l'implication des cellules microgliales dans les **fonctions synaptiques**. En effet, ce sont des cellules denses qui contactent les neurones et qui sécrètent des gliotransmetteurs. Elles pourraient donc jouer le même rôle que les astrocytes (Pascual *et al.* 2012). Bien que les cellules microgliales soient activées dans les études *in vitro*, ces dernières suggèrent la capacité des cellules microgliales à **moduler l'activité neuronale**.

Dès la levée de son inhibition ou dès son activation proprement dite, la réponse microgliale est rapidement mise en place et elle constitue bien la **première ligne de défense** contre une infection ou une atteinte du SNC. Les principales fonctions des cellules microgliales activées convergent vers le **nettoyage des débris tissulaires**, la **création d'un contexte favorable à la réparation** et la **résistance aux pathogènes**. Pour cela, elles font preuve d'une grande plasticité fonctionnelle et morphologique comme en témoignent les processus mis en jeu : migration et chimiotactisme, adhésion cellulaire, phagocytose, présentation antigénique, prolifération, immunosuppression, neuroprotection, cytotoxicité, apoptose.

Concernant la **phagocytose** (Fig. 32D), les cellules microgliales sont attirées par chimiotactisme au niveau des pathogènes ou des débris cellulaires à phagocyter, puis elles y adhèrent par des récepteurs de surface. L'adhérence est facilitée par l'**opsonisation** des pathogènes ou des débris par des anticorps ou des facteurs du complément. Des prolongements cytoplasmiques, ou pseudopodes, ingèrent l'élément dans le cytoplasme de la cellule microgliale. Le **phagosome** ainsi formé fusionne avec les lysosomes cellulaires. On parle ensuite d'**explosion respiratoire** au sein du phagolysosome permettant la digestion complète de l'élément. Les peptides issus de la dégradation sont présentés sur les molécules de CMH (Underhill & Goodridge 2012).

Elles participent à l'**amplification de la réponse immunitaire innée** via la production de cytokines pro-inflammatoires mais aussi à l'**établissement de la réponse adaptative** notamment par leur capacité de présentation antigénique. Les molécules de CMH de classe II sont exprimées

par les cellules microgliales quiescentes et activées et, contrairement aux astrocytes, elles expriment les molécules de costimulation type B7 nécessaires à une présentation antigénique activatrice (Gehrmann *et al.* 1993; Mittelbronn *et al.* 2001). Elles sont donc susceptibles d'activer ou de réactiver les lymphocytes infiltrant et d'induire des profils Th1, Th17 ou Th2. En retour, les lymphocytes influencent l'action microgliale (Fig. 15B).

b. L'évolution du concept de programme d'activation macrophagique et microgliale

M1 vs. M2, le point de vue classique

L'**hétérogénéité morphologique et fonctionnelle**, des macrophages puis des cellules microgliales, a été longuement décrite (Mantovani *et al.* 2002, 2004, 2005; Geissmann *et al.* 2010). Face à cette plasticité, une nomenclature officielle a voulu simplifier la désignation des phénotypes macrophagiques. *In vitro*, il avait été remarqué que la réponse macrophagique n'était pas la même en fonction des *stimuli* utilisés. Le LPS, utilisé couramment, induisait un profil spécialisé dans l'élimination des pathogènes non reproduit par d'autres cocktails cytokiniques (Fig. 33B). Suite à cette observation, deux phénotypes macrophagiques ont été définis par analogie avec les lymphocytes Th1 et Th2 : le **type M1**, dit « **activé classiquement** », de nature pro-inflammatoire, ou le **type M2**, dit « **activé autrement** », de nature anti-inflammatoire (Fig. 33A) (Allavena & Mantovani 2012). L'activation de l'un ou l'autre des profils dépend *in vivo* du contexte inflammatoire et de la séquence spatio-temporelle des *stimuli* au cours de la pathologie. La question de savoir si les cellules microgliales sont en adéquation avec les phénotypes M1 ou M2 au cours des pathologies du SNC reste en suspens. L'activation microgliale ne suit probablement pas parfaitement les mêmes voies de signalisation que les macrophages tissulaires mais il est communément admis d'attribuer des fonctions de type M1 ou M2 aux cellules microgliales (Ransohoff & Perry 2009).

In vitro, les **cellules de type M1** sont induits par l'IFN- γ seul ou avec des stimuli bactériens comme le LPS ou des cytokines pro-inflammatoires comme le TNF- α ou le GM-CSF (Mantovani *et al.* 2005; Martinez *et al.* 2008). Elles produisent principalement les **cytokines pro-inflammatoires** IL-12, IL-23, IL-1 β , TNF- α et IL-6 ainsi que des molécules effectrices incluant les espèces réactives de l'oxygène (ROS) et les dérivés azotés. Elles sont favorisées par, et induisent, la réponse de type **Th1** et **Th17** (Fig. 33A). Elles sont indispensables à la résistance contre de nombreuses bactéries, protozoaires ou virus, à la défense anti-tumorale et peuvent être responsables de la destruction tissulaire observée dans les pathologies chroniques. Au contraire, les **types M2**, qui regroupent en

fait tous les phénotypes ne ressemblant pas au phénotype M1, sont induits par les **cytokines anti-inflammatoires** IL-4, IL-10, IL-13 et TGF- β , des glucocorticoïdes et des hormones stéroïdes (Fig. 33B) (Mantovani *et al.* 2005). Ils produisent principalement de l'IL-10 associée à un large panel de cytokines inflammatoires. Ils sont dits **immuno-régulateurs**. Ils participent à la réponse de type **Th2**, au recrutement des **LT régulateurs**, à la réponse anti-parasitaire (Noël *et al.* 2004), à la progression tumorale mais aussi à la **réparation** et au **remodelage tissulaire** (Mantovani *et al.* 2005). Des marqueurs spécifiques permettent de les différencier des cellules M1. Par exemple, les cellules M2 expriment fortement les récepteurs éboueurs (SR), les récepteurs du mannose et du galactose. Elles peuvent aussi exprimer l'arginase (ARG) qui conduit à la production d'ornithine et de polyamines. Elles sont associées à l'expression du récepteur antagoniste de l'IL-1 β (IL-1ra) (Dinarello 2005).

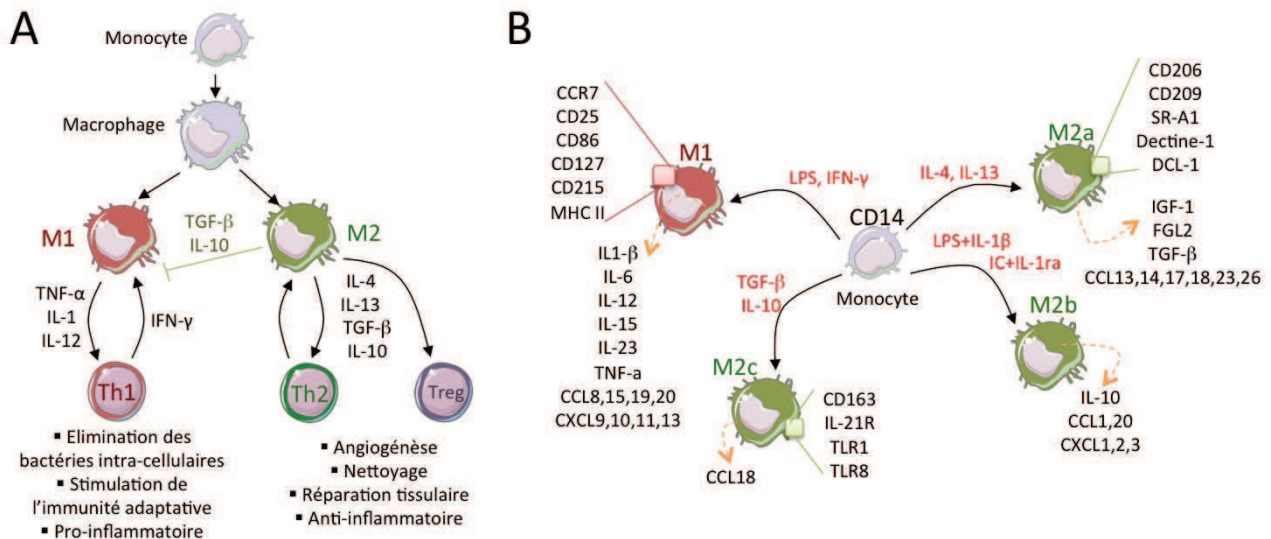


Figure 33 : Les programmes d'activation macrophagique. **A.** Nomenclature bimodale simplifiée des programmes d'activation macrophagique M1 et M2 (adaptée de Allavena & Mantovani 2012). **B.** Induction *in vitro* des profils macrophagiques sous l'effet de cocktail cytokinique (adaptée de Martinez *et al.* 2008). Une liste non exhaustive des marqueurs membranaires et des cytokines produites par les profils induits est proposée.

Les exemples d'intervention des macrophages M1 et M2 sont nombreux. Une vision simplifiée de la réponse macrophagique consiste à décrire des lignes successives de défense (Fig. 34) (Murray & Wynn 2012). La première est de **détecter les signaux de danger et l'invasion des pathogènes**. La deuxième est de **mettre en place une réponse pro-inflammatoire de type M1** associée à la production d'espèces cytotoxiques pour éliminer les micro-organismes et contrôler l'infection ou tout autre stress tissulaire. La plupart du temps, les macrophages tissulaires n'en sont pas capables seuls. Une troisième vague consiste donc au **recrutement des monocytes circulants** par la sécrétion de cytokines comme le G-CSF (Granulocyte colony stimulating factor) et de chimiokines comme CCL2 et CCL5. Les monocytes infiltrants se différencient ensuite en macrophages M1 pro-inflammatoires afin de soutenir la réponse des macrophages tissulaires. La

proportion de la réponse attribuée aux sous-populations macrophagiques n'est pas bien établie dans toutes les situations. Rapidement, les risques de dommages tissulaires augmentent face à la production excessive de médiateurs inflammatoires. C'est pourquoi, les macrophages M1 sont impliqués dans de nombreuses pathologies inflammatoires chroniques et maladies auto-immunes. La dernière vague de réponse est donc destinée à **rétablir l'homéostasie tissulaire** en supprimant l'inflammation précédente. Elle est médiée par les **macrophages M2** qui antagonisent les fonctions M1 puis favorisent la réparation tissulaire et la fibrose. Ils sont issus des macrophages M1 convertis en M2 ou bien de nouveaux monocytes. Ils sécrètent des protéines immuno-régulatrices comme l'IL-10, FIZZ-1, ARG et YM-1 (Chitinase-like protein). Les fibroblastes sont stimulés par les cytokines et les facteurs de croissance sécrétés par les macrophages M2, comme le TGF- β et le PDGF. Ils se différencient en myofibroblastes, synthétisant des fibres de collagène réparant ainsi la matrice extracellulaire. Sa dégradation est aussi stoppée par la production d'inhibiteurs de métalloprotéinases. Les macrophages M2 nettoie le tissu lésé en phagocytant les débris de cellules mortes et de la matrice endommagée. Ces composants pourraient continuer à promouvoir la réponse de type M1.

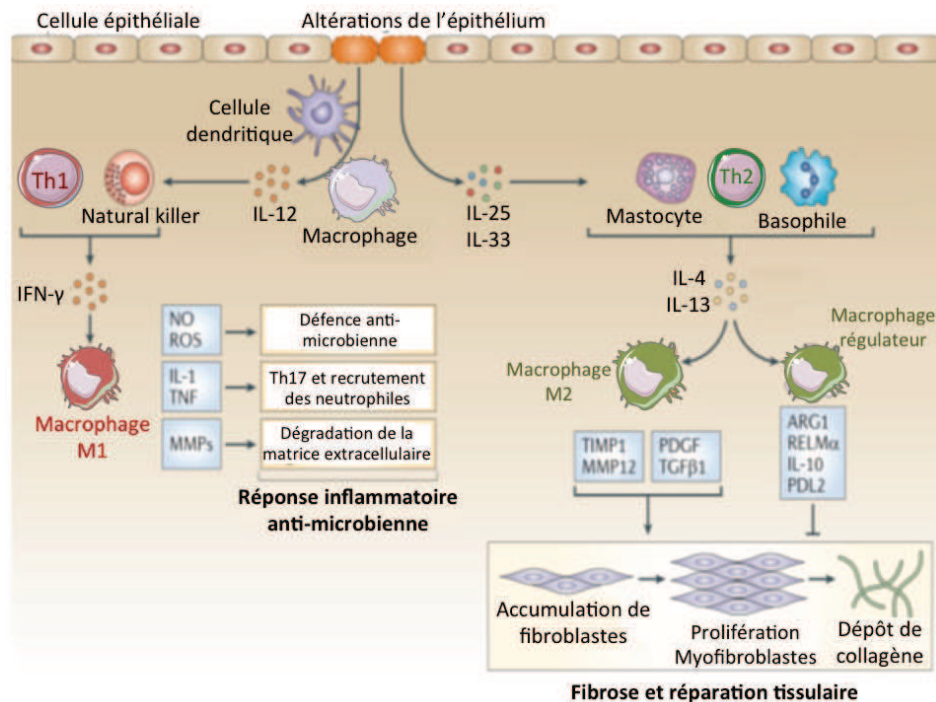


Figure 34 : Nomenclature M1 vs. M2 au sein d'une réponse inflammatoire complexe (figure adaptée de Murray & Wynn 2012).

En réalité, cette balance pro- vs. anti-inflammatoire est souvent complexe et ne permet pas de restaurer l'état initial. Nous allons en voir quelques exemples dans les maladies du SNC. Ici, nous ne citerons que l'exemple des tumeurs (Fig. 35A). Les **macrophages associés aux tumeurs** (TAM) seraient polarisés M2 (Mantovani *et al.* 2002). En effet, la majorité des tumeurs sécrète une grande quantité de CCL2 attirant les monocytes au sein de l'îlot tumoral. La perte du récepteur

CCR2 contient ces cellules dans la tumeur. Sous l'effet de l'IL-10 et du TGF- β , les monocytes se différencient et acquièrent des fonctions M2. Elles sont très peu cytotoxiques pour les cellules tumorales et contribuent au contraire à leur prolifération en supprimant la réponse immunitaire initiale de type M1 (Murray & Wynn 2012).

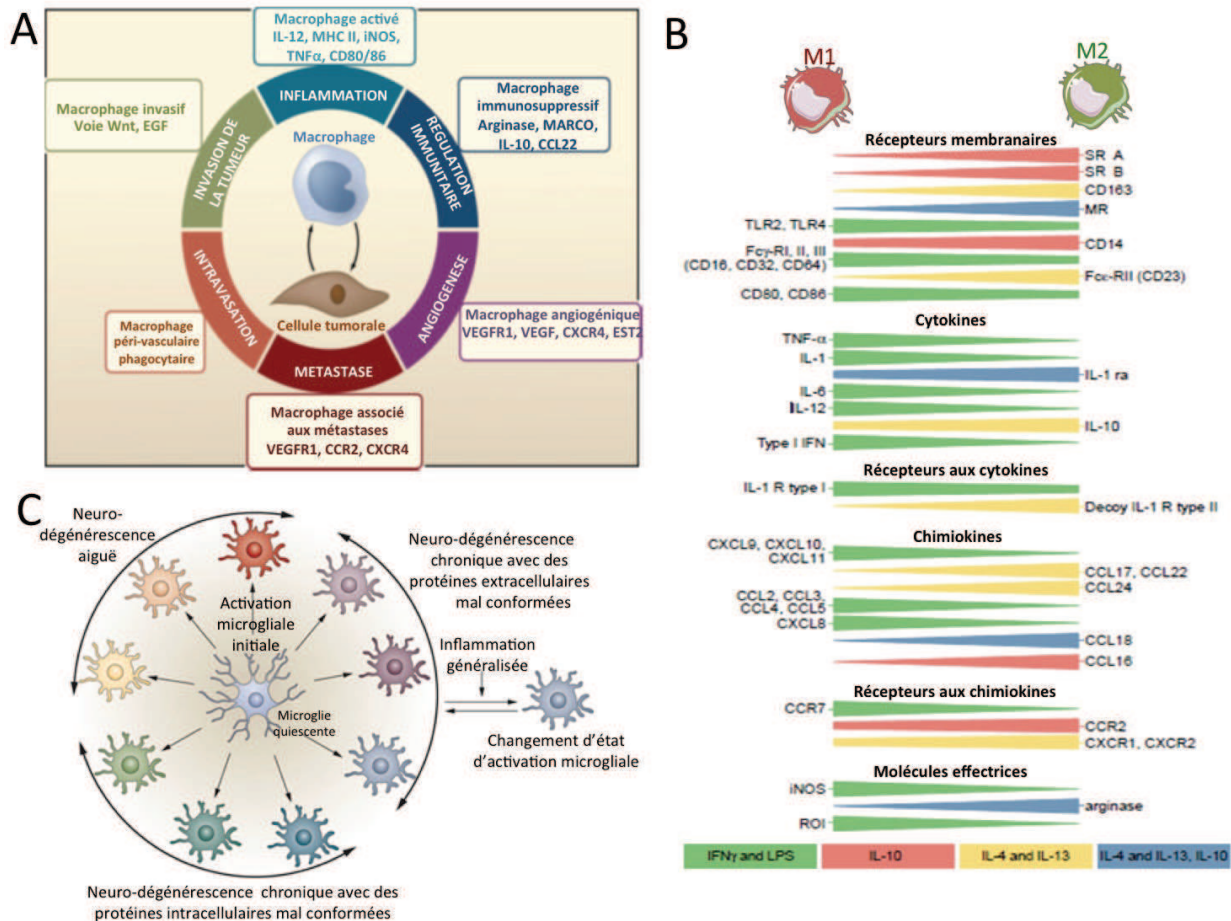


Figure 35 : Au-delà de la nomenclature M1/M2, un continuum d'activation des macrophages et des cellules microgliales. A. Plasticité fonctionnelle des macrophages associés aux tumeurs indépendamment de la nomenclature M1/M2 (adaptée de Quatromoni & Eruslanov 2012). B. Continuum moléculaire de l'expression des marqueurs entre les profils extrêmes M1 et M2 (extrait de Mantovani *et al.* 2002). C. Concept de la diversité fonctionnelle des cellules microgliales activées selon les contextes neuro-dégénératifs (adapté de Perry *et al.* 2010).

Vers une nomenclature plus fine...

Avec les marqueurs macrophagiques habituels, les cellules M1 et les différentes sous-classes de M2 peuvent être confondues (Fig. 35B). C'est la réponse moléculaire de chaque sous-population qui est différente. Depuis cette constatation, la nomenclature bimodale des macrophages est en train de vivre un tournant, passant d'une **désignation restrictive**, M1 vs. M2, à la reconnaissance d'une **véritable plasticité des macrophages** et d'un **spectre beaucoup plus large de leurs états d'activation** (Fig. 35B), incluant à la fois les macrophages « activés classiquement » mais aussi les « réparateurs », les « éboueurs », les « régulateurs »... (Mosser & Edwards 2008; Cunningham 2013). La polarisation M1/M2 ne doit être vue que comme une **simplification conceptuelle**

permettant de décrire le **continuum d'activation** qu'il existe entre ces deux extrêmes. Certains auteurs suggèrent même que les macrophages mettent en jeu **un profil d'activation spécifique de chaque pathologie** (Mantovani *et al.* 2004; Sica & Mantovani 2012) et que les précurseurs macrophagiques présenteraient déjà des spécificités liées à la maladie (Prinz *et al.* 2011). De la même façon, pour les **cellules microgliales**, il existe un **panel d'activation**, peut-être même plus large (Fig. 35C), allant de l'activation classique M1 à la voie alternative M2 (Perry 2010; Saijo & Glass 2011; Hanisch 2013; Ajmone-Cat *et al.* 2013). La séquence d'activation des cellules microgliales est encore débattue. Les différentes fonctions pourraient se succéder (activation séquentielle) ou bien différentes sous-populations microgliales seraient activées simultanément.

Diversité des profils macrophagiques/microgliaux dans la SEP

La SEP est souvent considérée comme la pathologie neuro-inflammatoire de référence. Les macrophages/cellules microgliales, longtemps strictement associés à la **destruction de la myéline**, présentent également des **phénotypes réparateurs** (Rawji & Yong 2013; Cao & He 2013).

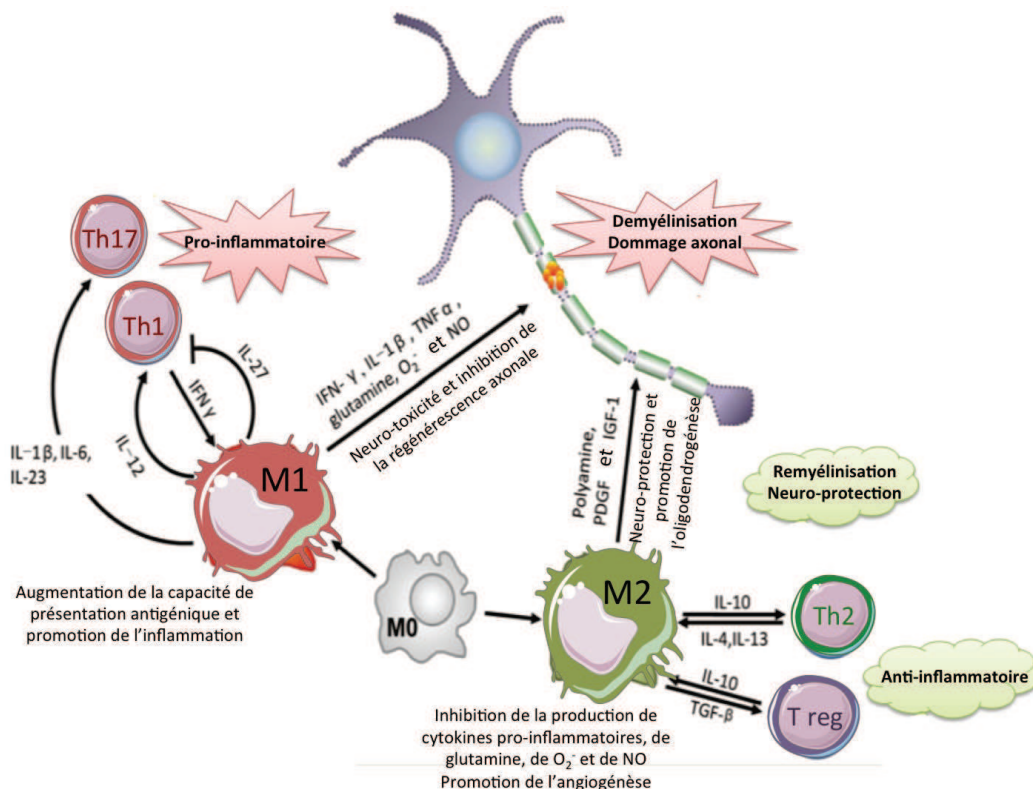


Figure 36 : Polarisation M1 vs. M2 de la réponse macrophagique et microgliale dans la SEP (figure adaptée de Cao & He 2013).

Ce paragraphe, développé dans les points suivants, vise à donner un bref aperçu de la balance pro- vs. anti-inflammatoire dans la SEP (Fig. 36). Les macrophages/cellules microgliales polarisés M1 seraient responsables de la **première phase destructive d'une lésion SEP**. Ils

initieraient la réponse inflammatoire aiguë et participeraient à l'activation des LT (Magnus *et al.* 2005). Ils seraient donc impliqués dans la mise en place de l'attaque auto-immunitaire (Goldmann & Prinz 2013). Au contraire, les cellules polarisées M2 participeraient **au nettoyage des lésions de démyélinisation** et favoriseraient la **remyélinisation** et **régénérescence axonale** (Mikita *et al.* 2011; Voss *et al.* 2012; Olah *et al.* 2012; Miron *et al.* 2013). On les retrouve au bord des lésions chroniques actives où elles soutiendraient la différenciation oligodendrocytaire. Mais pour comprendre pourquoi l'atteinte tissulaire ne cesse de progresser, des auteurs suggèrent que les voies d'activation M1 et M2 seraient altérées dans la SEP (Mikita *et al.* 2011). A ce sujet, des profils d'activation intermédiaires ont été décrits dans les lésions SEP (Vogel *et al.* 2013). La SEP est donc un exemple d'inflammation chronique où la séquence d'activation macrophagique/microgliale est perturbée.

c. Qu'en est-il des autres pathologies neuro-inflammatoires ?

La balance neuro-inflammation/neuro-dégénérescence vue à travers d'autres exemples

L'établissement d'un contexte neuro-inflammatoire

La SEP est l'exemple le plus connu de la neuro-inflammation chronique, mais l'implication de l'inflammation dans la quasi-totalité des maladies du SNC ne fait plus débat aujourd'hui, en particulier dans les maladies neuro-dégénératives ou assimilées. Nous ne citerons ici que cinq exemples que nous avons étudiés par la suite et présentés dans la table 3. Pour chacune d'entre elles, excepté peut-être pour la schizophrénie, des **mécanismes autonomes de mort neuronale** ont été décrits (Jellinger 2010). L'attaque primaire n'est pas, *a priori*, inflammatoire mais **dégénérative**, **métabolique** ou **ischémique**. On pensait donc que la **gliose réactionnelle** qui en résultait n'était pas spécifique de la maladie mais une réaction passive à l'atteinte neuronale (Zipp & Aktas 2006). Pourtant, sachant qu'un neurone n'est pas réellement autonome, on se doutait que la **perturbation des cellules gliales** devait contribuer à l'atteinte neuronale. Un des points communs des maladies neuro-dégénératives est l'accumulation de protéines mal conformées. Les cellules gliales pourraient contribuer à leur propagation. De même, les substances toxiques que les cellules microgliales activées sécrètent pour dégrader ces agrégats protéiques le sont aussi pour les neurones.

La preuve formelle que des **mécanismes non autonomes de mort neuronale** existent dans les maladies neuro-dégénératives a été apporté par les modèles de la **sclérose latérale**

amyotrophique (SLA) (Boillée *et al.* 2006; Beers *et al.* 2006; Boillée & Cleveland 2008; Barbeito *et al.* 2010). Les modèles murins spontanés de la SLA présentent une mutation dans le gène de la superoxyde dismutase 1 (SOD1). La présence de cette mutation dans les motoneurones serait impliquée dans l'initiation de la maladie alors que la même mutation dans les cellules gliales affecterait la progression de la maladie. L'implication de l'inflammation dans cette maladie a été suspectée depuis que des macrophages/cellules microgliales positifs pour les marqueurs CMH II et des dépôts d'immunoglobulines G avaient été observés à proximité des motoneurones, dans des études *post-mortem* (Troost *et al.* 1990; Engelhardt & Appel 1990).

Table 3 : Des pathologies du SNC.

	Région lésée	Perte neuronale	Neuropathologie	Conséquences
Sclérose latérale amyotrophique (SLA)	Tronc cérébral et moelle épinière	Perte sélective des motoneurones	Accumulation intra-neuronale de protéines mal conformées (SOD1, TDP-43...)	Atrophie musculaire Déficit moteur
Maladie de Parkinson	Substance noire (puis extension à d'autres régions)	Perte des neurones dopaminergiques (puis extension à d'autres populations)	Accumulation toxique de Synucléine α et de protéine Tau Corps de Lewi	Tremblements Rigidité Akinésie (lenteur d'initiation du mouvement)
Maladie d'Alzheimer	Lobes temporal et pariétal Hippocampe	Perte des neurones cholinergiques de l'hippocampe (puis extension à d'autres populations)	Accumulation de protéines A β Dépôt fibrillaire de protéines Tau	Démence
Maladie de Huntington	Ganglions de la base Cortex	Pertes des neurones striataux (puis extension à d'autres régions)	Accumulation toxique de Huntingtine	Mouvements anormaux Démence
Schizophrénie	Inconnue	Inconnue	Indéterminée	Troubles du comportement Troubles cognitifs

TDP-43 : Transactive response DNA binding protein 43

De même, dans la **maladie de Parkinson**, la **perpétuation de l'activation microgliale** contribuerait à l'atteinte neuronale mais les mécanismes moléculaires ne sont pas encore bien compris (McGeer *et al.* 1988; Barcia *et al.* 2011; Virgone-Carlotta *et al.* 2013). Les données sont contradictoires sur l'effet des thérapies anti-inflammatoires (Hirsch *et al.* 2012). Les modèles animaux montrent que l'infiltration de cellules immunes, notamment de LT, est secondaire à la dégénérescence. Une réponse des LT pourrait être dirigée contre la **Synucléine- α** retrouvée dans les ganglions lymphatiques.

Depuis longtemps, la réponse inflammatoire innée a été décrite dans la **maladie d'Alzheimer** (Heneka & O'Banion 2007; Liu *et al.* 2013). Les traitements anti-inflammatoires ont montré des effets positifs chez les patients mais la contribution de l'inflammation à la maladie reste à élucider. Les **peptides A β** , en plus de leurs effets toxiques directs, participeraient à l'**activation microgliale et astrocytaire**, produisant à leur tour des cytokines et des substances toxiques (Tan 1999; Akiyama *et al.* 2000).

Dans la **maladie de Huntington**, les agrégats de Huntingtine, issus de l'**expansion de cette polyglutamine**, s'accumulent et sont toxiques dans les neurones striataux et corticaux mais aussi dans les astrocytes et les cellules microgliales. Ils provoquent la perte des fonctions protectrices des astrocytes, qui contribuent alors à l'excitotoxicité du glutamate. En même temps, les agrégats activent les cellules microgliales, sécrétant soit des substances neuro-toxiques soit neuro-protectrices (Sapp *et al.* 2001; Ellrichmann *et al.* 2013).

Enfin, la **schizophrénie** a longtemps été considérée comme un désordre strictement psychiatrique. Mais depuis que des bases neurologiques ont été démontrées, un rôle de l'inflammation est aussi envisagé. Le **profil cytokinique** sanguin des patients est d'ailleurs perturbé suggérant une réponse inflammatoire particulière des LT et des macrophages/cellules microgliales (Smith & Maes 1995; Monji *et al.* 2009; Miller *et al.* 2011).

Ainsi, l'implication de la **neuro-inflammation** dans les mécanismes de neuro-dégénérescence a contribué à l'élaboration des hypothèses auto-immunitaires ou infectieuses. Bien sûr, il se peut fortement que l'atteinte du neurone soit l'évènement déclenchant et que la neuro-inflammation n'en soit qu'une conséquence (Perry *et al.* 1998; Zipp & Aktas 2006; Frischer *et al.* 2009; Perry 2010; Cappellano *et al.* 2013). Mais il se pourrait bien que le **cercle vicieux de la neuro-dégénérescence et de la neuro-inflammation** soit à l'origine de ces pathologies chroniques.

Les profils d'activation macrophagique/microgliale en contexte neuro-dégénératif

Parmi les mécanismes de la neuro-inflammation, l'**activation macrophagique/microgliale** semble tenir la place la plus importante (Lucin & Wyss-Coray 2009; Perry *et al.* 2010). Les cellules microgliales sont les premières à être sensibles à l'atteinte neuronale. Leur prolifération puis le recrutement de nouveaux macrophages, qui prennent l'allure de cellules microgliales, orchestrent le reste de la réponse immunitaire mise en place. Des **fonctions à la fois destructives et protectrices** ont été décrites en fonction du site lésionnel ou du stade de la maladie. Nous ne citerons ici que quelques exemples tirés des cinq maladies présentées :

Dans la sclérose latérale amyotrophique (SLA)

Chez les patients, l'activation microgliale est observée à **proximité des motoneurones dégénératifs** (Troost *et al.* 1990). Dans les modèles de la SLA, les effets négatifs de la microglie ont été montrés par la survie plus longue des animaux exprimant un faible niveau de SOD1 mutée dans la microglie (Boillée *et al.* 2006; Beers *et al.* 2006). *In vitro*, les cellules microgliales exprimant la SOD1 mutée sécrètent davantage d'ions superoxydes et de NO. Dans ces études, on ne peut pas réellement distinguer la contribution des cellules microgliales et des macrophages recrutés. Des fonctions protectrices de type M2 des cellules microgliales ont été détectées au stade précoce

du modèle animal qui tendraient à disparaître au profit du type M1 neurotoxique avec l'avancée de la maladie (Barbeito *et al.* 2010; Liao *et al.* 2012). Plus précisément, un **gradient d'activation microgliale** est observé, du profil M1 dans la partie lombaire de la moelle épinière vers un profil M2 protecteur dans la partie cervicale (Beers *et al.* 2012).

Dans la maladie de Parkinson

L'activation des cellules microgliales HLA-DR⁺ est observée dans la **substance noire** des patients (McGeer *et al.* 1988). Dans un modèle animal induit par l'injection intra-striatale de 6-hydroxydopamine, l'**accumulation microgliale** précéderait la dégénérescence des neurones dopaminergiques et y contribuerait par microphagocytose (Virgone-Carlotta *et al.* 2013). Le rôle dualiste des cellules microgliales est également discuté dans la maladie de Parkinson et les autres synucléinopathies (Sanchez-Guajardo *et al.* 2013). Le panel cytokinique des patients suggèrent l'intervention des cellules microgliales de type M1 et M2 (Brodacki *et al.* 2008). Après des fonctions neuro-protectrices, elles deviendraient neuro-toxiques en conséquence de la surproduction d'espèces réactives de l'oxygène et de l'azote, de cytokines et de l'effet de la Synucléine- α . Le profil M2 serait donc à favoriser pour promouvoir la neuro-protection et la régénérescence.

Dans la maladie d'Alzheimer

L'étude qui a montré l'activation microgliale chez les patients atteints de la maladie de Parkinson a fait la même observation chez les patients atteints de la maladie d'Alzheimer (McGeer *et al.* 1988). Les **plaques amyloïdes** sont remplies de cellules microgliales qui ont encore une fois un rôle dualiste (Benveniste *et al.* 2001; Weitz & Town 2012; Varnum & Ikezu 2012). L'activation de la microglie interviendrait précocement dans la maladie (Cagnin *et al.* 2001). Ces observations sont retrouvées chez les modèles transgéniques qui reproduisent les dépôts amyloïdes mais la plupart des modèles ne sont pas vraiment progressifs. Sous un profil M2, elles phagocytent les peptides A β afin d'en protéger les neurones et de réduire la formation des plaques amyloïdes. Pourtant, les plaques semblent s'accumuler avec l'âge et le nettoyage devient inefficace. Avec le temps, les peptides A β activent les cellules microgliales vers un profil M1, entraînant la sécrétion d'espèces radicalaires (NO et ions superoxydes) et d'agoniste du glutamate qui contribuent ainsi aux dommages neuronaux (Brown & Bal-Price 2003). *In vitro*, le contact des peptides A β induit effectivement l'activation des cellules microgliales. En réalité, le **vieillessement** seul est capable d'induire la conversion M2 vers M1 mais la progression de la maladie le favoriserait. Les molécules IL-4 et CD200, des marqueurs de type M2, ont été proposées comme cibles thérapeutiques pour leur potentiel anti-inflammatoire (Varnum & Ikezu 2012). Enfin, des essais de vaccination non concluants par le peptide A β visaient à augmenter la phagocytose des dépôts amyloïdes et à empêcher leur formation par la production d'anticorps anti-A β (Ransohoff & Perry 2009).

Dans la maladie de Huntington

Même si la cause de la maladie de Huntington est beaucoup mieux comprise que celle des maladies précédentes, on cherche à comprendre l'implication de l'activation microgliale dans la maladie qui apparaît très tôt au cours de la maladie (Sapp *et al.* 2001; Shin *et al.* 2005; Björkqvist *et al.* 2008; Politis *et al.* 2011; Ellrichmann *et al.* 2013). Les cellules microgliales réagissent à la **présence de Huntingtine mutée** et sécrètent en conséquence des cytokines pro-inflammatoires et du NO neurotoxique. La microglie phagocytaire sécréterait également des facteurs neuro-protecteurs.

Dans la schizophrénie

La nature neuro-dégénérative de la Schizophrénie n'est pas claire. On ne sait donc pas si ce sont les dommages neuronaux qui participent à l'**activation microgliale** observée chez les patients psychiatriques (Monji 2012). Des anomalies de gènes exprimés par les astrocytes et les oligodendrocytes contribueraient à la susceptibilité de développer la schizophrénie (Goudriaan *et al.* 2013). Ces anomalies pourraient altérer le fonctionnement microglial. Des antidépresseurs et des antipsychotiques auraient des effets inhibiteurs sur l'activation microgliale, favorisant un profil M2 protecteur (Monji 2012). Même si l'activation microgliale n'est probablement pas à l'origine de la maladie, elle reste une cible thérapeutique potentielle.

Le cercle vicieux de la persistance de l'inflammation chronique

Comme nous l'avons détaillé, les cellules microgliales et les macrophages recrutés sont responsables du maintien de l'homéostasie tissulaire et préviennent l'installation de l'inflammation chronique. Un premier niveau d'activation pro-inflammatoire des cellules microgliales conduirait au recrutement de monocytes et à l'activation de la réponse Th1. Puis, la détection d'une atteinte tissulaire, indépendante de sa nature intrinsèque ou microbienne et donc indépendante de la première phase, déclencherait rapidement une réponse anti-inflammatoire afin de soutenir la réponse anti-inflammatoire basale des cellules microgliales. La dernière phase, peu comprise, serait décisive dans le rétablissement de l'homéostasie ou, au contraire, la **mise en place d'une inflammation chronique** observée dans les **pathologies chroniques du SNC** (Murray & Wynn 2012).

Dans le cas d'un accident vasculaire, la mort neuronale est extrêmement rapide, l'histoire de quelques minutes. L'activation microgliale est alors soudaine. Dans les pathologies neuro-dégénératives, l'accumulation de protéines mal-conformées ou mutées et/ou un *stimulus* inconnu conduisent à une perte progressive des neurones sur des dizaines d'années. L'activation microgliale

se passe alors en de multiples étapes qui pourraient conduire à des **changements adaptatifs** des populations microgliales (Ransohoff & Perry 2009). Même si les cellules microgliales sont activées précocement dans la maladie, leurs fonctions vont différer au fil des années. Certains auteurs parlent de « **priming** » des **cellules microgliales** (Perry *et al.* 1998; Perry 2010; Cunningham 2013; Ajmone-Cat *et al.* 2013). Elles deviennent **hypersensibles aux stimulations ultérieures**, les neurones continuant à dégénérer par exemple (Lyman *et al.* 2013). Leurs réponses sont alors disproportionnées ou aberrantes contribuant alors à l'atteinte neuronale et **perpétuant la réponse inflammatoire**. A ce niveau d'observation, il n'est plus possible de déterminer si l'activation microgliale est **une cause ou une conséquence de l'atteinte neuronale**.

Nous avons ici présenté les grandes fonctions des cellules gliales en conditions physiologiques et dans des conditions pathologiques en général. Les chapitres suivants nous permettront de comprendre un peu mieux les interactions établies entre les cellules gliales dans le contexte de la SEP et comment l'altération d'un type cellulaire ne peut pas rester sans effet sur les cellules de son environnement. Ainsi, nous aurons un aperçu de l'état de la balance délétère vs. protectrice dans la SEP.

B/ Démyélinisation et atteinte neuronale dans la SEP : une action concertée des cellules gliales

1) La démyélinisation classique

a. Des arguments pour un profil délétère des macrophages et cellules microgliales

Une des caractéristiques des lésions actives de démyélinisation de la SEP est l'**accumulation de macrophages/cellules microgliales** remplis de myéline et des produits de sa dégradation. Il s'agirait plutôt de cellules microgliales activées et non de macrophages recrutés dans les stades les plus précoces de démyélinisation (Li *et al.* 1996; Ponomarev *et al.* 2005) Les produits de dégradation de la myéline sont plus avancés dans les lésions actives tardives (LFB⁺, PLP⁺ mais MOG⁻) que les lésions actives précoces (MOG⁺, LFB⁺) (Brück *et al.* 1995). Dans ces études *post-mortem*, on retrouve une corrélation entre l'accumulation de cellules microgliales et la perte d'oligodendrocytes et non avec la perte axonale (Lucchinetti *et al.* 1999). Au contraire, les lésions inactives présentent des cellules microgliales avec des vacuoles vides. Le cas particulier des lésions

corticales présente une forte activation microgliale suggérant leur forte implication dans la démyélinisation corticale par des processus plus diffus (Kutzelnigg *et al.* 2005; Kooi *et al.* 2012).

Les arguments pour un **rôle destructeur des cellules microgliales/macrophages** dans l'initiation de la SEP ne manquent pas. Des études continuent de montrer aujourd'hui l'effet bénéfique de réduire l'activation microgliale, notamment dans les modèles EAE, que ce soit via l'action de drogue comme la tétracycline ou le dipyridamole (Popovic *et al.* 2002; Sloka *et al.* 2013) ou via la déplétion totale des cellules microgliales (Heppner *et al.* 2005). L'initiation de l'EAE est retardée et les symptômes, moins sévères. Dans l'EAE, les cellules microgliales prolifèrent dès qu'elles sont activées (Ajami *et al.* 2011). Dans la SEP, le *stimulus* initial qui active les cellules microgliales est inconnu. Les premiers dégâts tissulaires conduisent ensuite à leur sur-activation, comme on peut l'observer dans l'EAE. Parmi les régulateurs de l'activation initiale microgliale récemment mis en évidence dans les modèles SEP, on peut citer le rôle du **système du complément** (Ramaglia *et al.* 2012). En outre, une équipe a identifié un micro-ARN non codant, le **miR-124**, fortement exprimé dans les cellules microgliales ramifiées et réprimé dans les cellules activées (Ponomarev *et al.* 2011). L'injection de ce micro-ARN retarde le développement de l'EAE et améliore les scores cliniques. Il permettrait de maintenir le profil M2 bénéfique de la microglie. De la même façon, les protéines de la famille des suppresseurs de la signalisation des cytokines (SOCS) dont **SOCS3** sont inhibées, permettant au profil M1 de s'installer (Qin *et al.* 2012). Les cellules microgliales déficientes pour SOCS3 sont davantage neurotoxiques.

b. Le profil M1, activateur des lymphocytes T

Le profil délétère a été démontré principalement dans l'EAE mais aussi dans la démyélinisation induite par le virus de Theiler. Ce profil correspond au **profil M1 des cellules microgliales/macrophages** (Gerhauser *et al.* 2012). C'est l'action des **cytokines pro-inflammatoires** dont l'IFN- γ , le TNF- α , l'IL-1 β et de l'IL-6 qui polarise les cellules microgliales vers le phénotype M1 cytotoxique (Goldmann & Prinz 2013). En retour, elles expriment ces mêmes cytokines ayant une **action paracrine** sur les cellules microgliales adjacentes. Elles expriment aussi l'IL-2 favorisant la prolifération des LT, l'IL-12, l'IL-23 et l'IL-17 favorisant la polarisation Th1 et Th17 des LT (Merson *et al.* 2010). La polarisation M1 inclut également l'induction de l'expression de iNOS et de la cyclooxygénase-2 (COX-2). La production de **NO** qui en résulte et celle de **TNF- α** constituerait deux médiateurs majeurs de la **démyélinisation** produits par les cellules M1 identifiés au sein des lésions SEP (Selmaj & Raine 1988; Mitrovic *et al.* 1994). Les voies de signalisation immunitaires classiques, comme NF- κ B (Nuclear factor- κ B) ou ERK (Extra-cellular signal-regulated kinase) sont aussi activées (Goldmann & Prinz 2013). On sait que l'activation constitutive

de ces voies est délétère dans l'EAE (Ellrichmann *et al.* 2012). Les cellules microgliales M1 sécrètent enfin un panel de chimiokines participant au recrutement des autres cellules immunes. La délétion de la chimiokine CCL2 par exemple réduit la sévérité de l'EAE (Ge *et al.* 2012).

L'**action phagocytaire** des cellules microgliales est ambiguë. D'un côté, elle assure le nettoyage des débris myéliniques indispensable à la remyélinisation mais de l'autre, elle produit une grande quantité de substances toxiques en induisant l'explosion respiratoire nécessaire à la dégradation des débris (Goldmann & Prinz 2013). Dans l'EAE, la phagocytose des débris myéliniques conduit effectivement à la production de cytokines pro-inflammatoires.

Comme énoncé, les cellules microgliales M1 agissent sur le recrutement et la différenciation des **lymphocytes Th1** et **Th17** (Magnus *et al.* 2005). Elles participeraient également à leur «priming» en tant que **cellules présentatrices d'antigènes** (CPA) en présentant des peptides de myéline (Mack *et al.* 2003). Dans les lésions SEP et EAE, les cellules microgliales expriment fortement les molécules de CMH de classe I et II et les molécules de co-stimulation CD40 et CD80/86. Elles sont donc capables comme les cellules dendritiques de fournir aux LT les deux signaux nécessaires à leur activation. On ne sait pas si elles activent ou réactivent les LT sur le site lésionnel. En tout état de cause, cette présentation antigénique participe au mécanisme d'«épitope spreading» dirigeant la réponse auto-immunitaire contre de nouveaux antigènes de myéline ou d'autres protéines.

2) Une autre vision de la démyélinisation : l'atteinte des oligodendrocytes, une atteinte primaire ?

a. L'atteinte des oligodendrocytes dans la SEP

Une analyse quantitative des oligodendrocytes a montré une large **variabilité de la perte oligodendrocytaire** au sein des lésions (Lucchinetti *et al.* 1999). Dans plus de la moitié des cas, il existe une perte oligodendrocytaire dans les zones actives de démyélinisation qui n'est pas observée dans les zones inactives ou de remyélinisation suggérant un recrutement des oligodendrocytes. Pour les autres cas, ce recrutement semble absent.

Barnett et Prineas ont décrit une **mort précoce des oligodendrocytes par apoptose** dans des zones de pâleur myélinique avant même la formation d'une vraie lésion, chez les rares patients atteints de formes rémittentes décédés au cours d'une poussée (Fig. 37A) (Barnett & Prineas 2004). Dans ces cas particuliers, l'apoptose des oligodendrocytes est observée conjointement avec une activation microgliale mais en l'absence de phagocytose de myéline et d'infiltration lymphocytaire. De la même façon, les types lésionnels 3 et 4 de la classification de Lucchinetti suggèrent fortement

une atteinte oligodendrocytaire (Lucchinetti *et al.* 2000). Dans le type 3, la perte de la protéine MAG est associée à des altérations de la région péri-axonale des oligodendrocytes déjà décrite quelques années avant (Rodriguez & Scheithauer 1994).

b. L'hypothèse de Barnett et Prineas

Suite à leurs observations, Barnett et Prineas ont suggéré l'**atteinte primitive des oligodendrocytes** comme l'atteinte initiale de la SEP (Barnett & Prineas 2004; Barnett & Sutton 2006). L'apoptose des oligodendrocytes serait le premier événement des nouvelles lésions en formation. L'atteinte tissulaire serait ensuite amplifiée par un recrutement secondaire d'une réponse inflammatoire systémique. Des débris myéliniques ou des changements moléculaires précoces des gaines de myéline attireraient et activeraient les cellules microgliales locales, à l'origine du recrutement et de l'amplification dramatique de la réponse inflammatoire.

Cette hypothèse créa un tournant dans la vision traditionnelle des lésions actives phagocytaires selon laquelle la réponse myéline-antigène-spécifique est médiée par la réponse Th1. Les LT activent les macrophages qui détruisent une gaine de myéline intacte. Ici, les auteurs ont introduit le terme de **lésions pré-phagocytaires** pour décrire ce qui se passe avant la phagocytose dans les lésions naissantes (Fig. 37B) (Barnett & Prineas 2004; Barnett *et al.* 2006). Cette hypothèse remet en question la vision longtemps supportée par l'EAE. En effet, les signes d'apoptose, probablement indépendante des caspases, sont observés en l'absence d'une pathologie structurelle flagrante de la myéline, d'infiltration massive de macrophages et de LT. Une vacuolisation des gaines de myéline due à des œdèmes intra-myéliniques est observée mais elle serait secondaire à la phagocytose des corps cellulaires oligodendrocytaires. Les macrophages apparaîtraient alors comme de simples « charognards » en quête de myéline altérée comme en avait eu l'intuition Dawson au début du XX^{ème} siècle (Dawson 1916; Barnett *et al.* 2006). L'exposition de la phosphatidylsérine sur la membrane extracellulaire des oligodendrocytes altérés participerait à l'activation des cellules microgliales.

La SEP serait alors une pathologie de la myéline (myélinopathie) ou une **oligodendroglieopathie**, conduisant à la réponse auto-immune connue (Stys *et al.* 2012). Ce mécanisme pourrait être commun à l'ensemble des classes lésionnelles décrites par Lucchinetti, reflétant une chronologie des stades lésionnels plutôt qu'une hétérogénéité étiologique entre les patients (Barnett *et al.* 2009b). En réalité les mécanismes à l'origine de l'atteinte oligodendrocytaire ne sont pas connus. Des hypothèses accusent des phénomènes d'hypoxie ou d'ischémie, de stress oxydatif ou d'excitotoxicité, un dysfonctionnement mitochondrial, une infection virale persistante ou l'action d'une toxine inconnue (Lucchinetti *et al.* 2000; Aboul-Enein & Lassmann 2005; Stys *et al.* 2012). Face à cet inconnu, l'hypothèse de Barnett et Prineas est largement contestée. En effet, le

phénomène d'apoptose des oligodendrocytes a été observé dans de rares cas de patients décédés quelques jours après le début d'une poussée. Il est difficilement observable même sur des tissus frais car il ne dure que quelques heures alors que les processus phagocytaires peuvent durer plusieurs semaines (Frohman *et al.* 2006). Pourtant, cette hypothèse peut concorder avec l'hypothèse auto-immune. La mort de quelques oligodendrocytes suffirait à démasquer des auto-antigènes à l'origine de la réponse immune systémique. Ou bien, un antigène étranger impliqué dans la mort des oligodendrocytes fournirait le stimulus nécessaire à la réponse inflammatoire systémique. Dans les ganglions lymphatiques, des cellules dendritiques pourraient dériver des cellules microgliales ou macrophages en provenance du SNC lésé et activer les LT en périphérie.

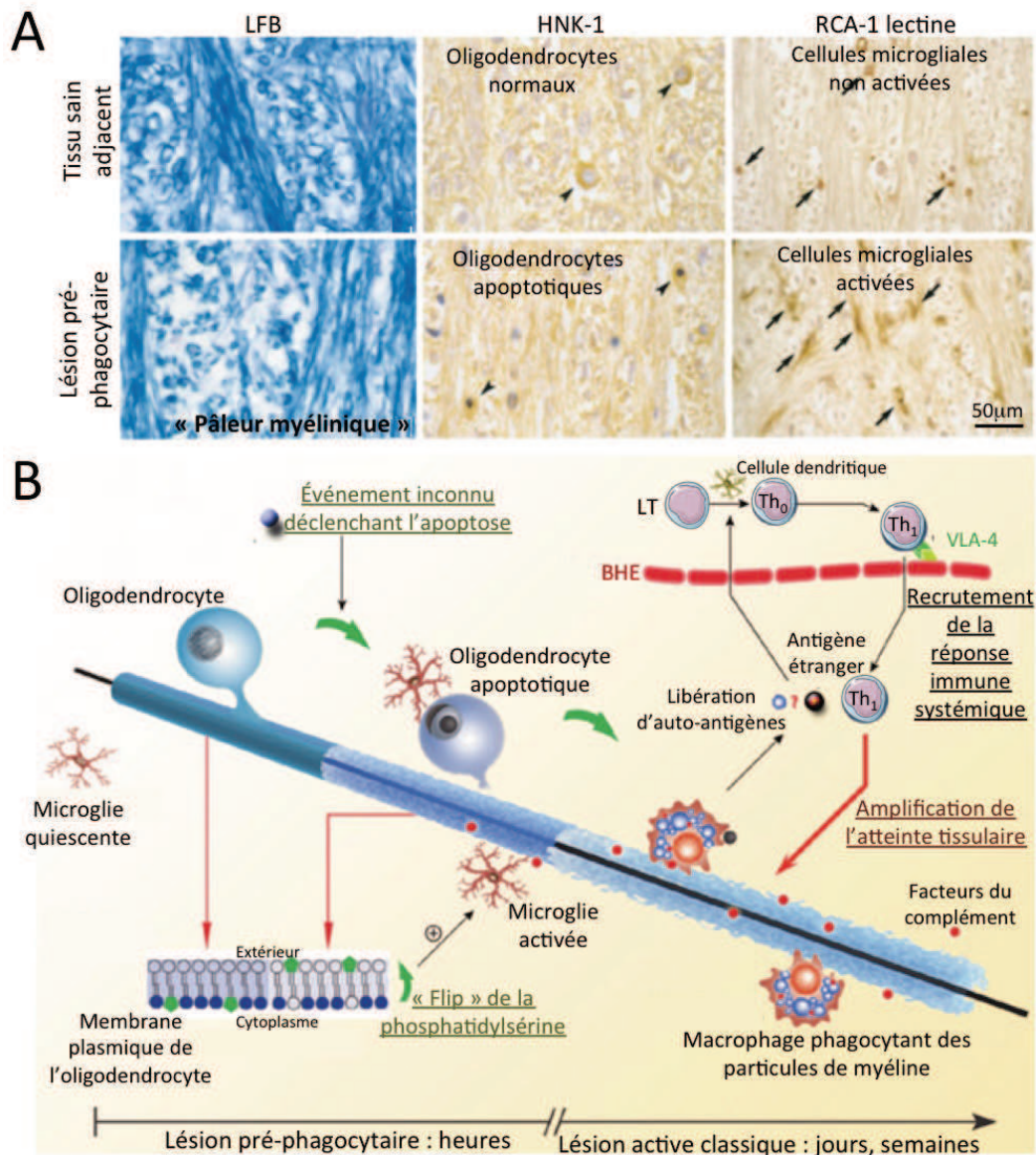


Figure 37 : Les lésions pré-phagocytaires. A. Observation conjointe de l'apoptose des oligodendrocytes précédant la démyélinisation et de l'activation microgliale au sein des lésions pré-phagocytaires (images extraites de Barnett & Prineas 2004). LFB : Luxol fast blue ; HNK-1 : Human natural killer 1 ; RCA-1 : Ricinus communis agglutinin-1. B. Hypothèse d'une atteinte primitive des oligodendrocytes précédant la démyélinisation classique (d'après Barnett *et al.* 2009b).

c. Vers de nouveaux modèles de la SEP

Même si des mécanismes d'apoptose des oligodendrocytes sont observés dans l'EAE, ce modèle ne permet pas d'étudier l'hypothèse d'une atteinte primitive des oligodendrocytes (Hövelmeyer *et al.* 2005). Une telle atteinte oligodendrocytaire a été décrite dans les modèles de démyélinisation toxique, induite par un virus ou de dégénérescence (Ludwin & Johnson 1981; Lucchinetti *et al.* 2000).

Des modèles toxiques d'atteintes oligodendrocytaires

Chez des animaux, l'**induction de la démyélinisation par le Cuprizone** repose sur la toxicité de cette molécule pour les oligodendrocytes (Ludwin 1978; Kipp *et al.* 2009). Le Cuprizone est un chélateur du cuivre (Cu), essentiel à certaines enzymes comme la Cu/Zn superoxyde dismutase. La déficience en Cu entrainerait la pathologie mais l'apport de Cu ne suffit pas à restaurer le phénotype normal. On ne sait pas non plus pourquoi les oligodendrocytes sont préférentiellement touchés. L'avantage de ce modèle est qu'il suffit de nourrir les animaux avec le Cuprizone. Il permet d'étudier la démyélinisation puis la remyélinisation si l'apport de Cuprizone est stoppé. Son administration prolongée conduit à des altérations mitochondriales et des problèmes hépatiques. De même, la **démyélinisation induite par l'injection de LPS** dans le corps calleux conduit à l'activation microgliale puis très rapidement à une apoptose des oligodendrocytes avant même la démyélinisation (Zhang *et al.* 2013b).

Les modèles de dégénérescence des oligodendrocytes

Des modèles d'animaux transgéniques ont permis de reproduire des lésions pré-phagocytaires. Des **souris transgéniques pour le TNF**, constitutivement exprimé sous forme membranaire, développent des lésions de démyélinisation spontanées (Akassoglou *et al.* 1998). Les gaines de myéline sont vacuolisées, les oligodendrocytes meurent par apoptose et entraînent une activation microgliale. Les cellules immunitaires infiltrent ensuite le SNC, prolongeant la démyélinisation et la perte axonale. L'exemple de la **surexpression de la protéine de myéline PLP** conduit de la même façon à une atteinte de la myéline puis à une activation du SI (Ip *et al.* 2007). De même, la **délétion du gène de la protéine MAG** induit la dégénérescence des prolongements oligodendrocytaires puis la mort des oligodendrocytes (Baumann & Pham-Dinh 2001). Néanmoins, dans ces études, l'atteinte oligodendrocytaire est généralisée. Une étude récente a démontré que la mort diffuse des oligodendrocytes n'était pas suffisante pour induire une réaction auto-immunitaire (Locatelli *et al.* 2012).

3) Altérations fonctionnelles des cellules gliales dans la SEP

a. Des altérations astrocytaires

Puisque la NMO a longtemps été considérée comme un sous-type de la SEP et que la démyélinisation y est précédée d'une **atteinte astrocytaire**, on peut se demander dans quelle mesure les astrocytes sont affectés dans la SEP. La **gliose réactionnelle et fibrillaire des astrocytes** a été décrite dans les lésions actives et chroniques de la SEP mais peu d'attention s'est portée sur le potentiel pathogénique des altérations astrocytaires (Wu & Raine 1992; Lassmann *et al.* 2007). Dans la NMO, l'**astrocytopathie** est médiée par les anticorps anti-AQP4. Une étude a montré que des dommages astrocytaires précédant la démyélinisation étaient également possibles indépendamment des anticorps (Sharma *et al.* 2010). L'injection de LPS induit une activation microgliale de la SB suivie d'altérations astrocytaires caractérisées par la perte d'AQP4 et la rétraction des pieds astrocytaires (Sharma *et al.* 2010; Zhang *et al.* 2013b). La **perte de connexines**, formant notamment les jonctions communicantes astrocyte-oligodendrocyte, serait à l'origine de la démyélinisation observée par la suite.

En ce sens, des altérations astrocytaires ont été décrites dans certaines lésions SEP. On retrouve la **perte des pieds astrocytaires péri-vasculaires** principalement dans le **type 3 des lésions actives** chez les patients atteints de SEP sévères (Lucchinetti *et al.* 2000; Sharma *et al.* 2010). Elle est associée à des **dépôts de collagène extracellulaires**, signes d'une atteinte astrocytaire, et à une **forte expression d'AQP4** (Sinclair *et al.* 2007; Misu *et al.* 2007; Roemer *et al.* 2007; Sharma *et al.* 2010). On sait d'ailleurs que l'expression d'AQP4 et celle des connexines sont étroitement co-régulées dans les cultures d'astrocytes humains (Nicchia *et al.* 2005). Il n'est donc pas étonnant de retrouver une **perturbation de l'expression de plusieurs connexines** non seulement dans les plaques mais aussi dans la SBAN (Markoullis *et al.* 2012). Dans et autour des plaques, l'augmentation de la Cx43 sur les astrocytes et la diminution de la Cx32 et de la Cx47 sur les oligodendrocytes perturberaient la formation du réseau astrocyte-oligodendrocyte que nous avons vu nécessaire aux fonctions métaboliques de chacun d'entre eux (Fig. 28D). Dans la SBAN, la Cx43 est augmentée plus légèrement. Les modèles murins double-déficients en connexines astrocytaires et oligodendrocytaires présentent effectivement une vacuolisation sévère des gaines de myéline et une perte astrocytaire.

Si les implications fonctionnelles de ces changements moléculaires ne sont pas bien connues dans la SEP, ils contribueraient à l'**amplification de la réponse immunitaire**. En effet, les astrocytes activés, ou altérés, ont des effets délétères. Par exemple, l'inactivation du facteur de transcription NFκB dans les astrocytes s'est montrée bénéfique pour l'EAE (van Loo *et al.* 2006).

Dans la SEP, les astrocytes réactifs participent au recrutement des cellules immunitaires, notamment les cellules dendritiques et les cellules productrices d'anticorps, en augmentant leur production de chimiokines comme CXCL12, CXCL13 et BAFF (B cell activator factor of the TNF family) (Krumbholz *et al.* 2005, 2006; Ambrosini *et al.* 2005). Par analogie avec la NMO, la perturbation des fonctions astrocytaires est susceptible de participer à l'atteinte myélinique et donc, au moins dans une sous-catégorie de lésions, jouer un rôle dans la cascade des événements qui conduit à la formation des lésions SEP (Brosnan & Raine 2013). Cependant, contrairement aux lésions de NMO, on retrouve peu de zones entièrement dépourvues d'astrocytes dans la SEP. Ce sont surtout les prolongements astrocytaires qui sont affectés. L'hypothèse d'une astrocytopathie existe également dans d'autres pathologies neuro-inflammatoires. Dans l'épilepsie, par exemple, il a été décrit des anomalies de fonctionnement du canal potassique astrocytaire Kir4.1 et la perte du couplage astrocytaire, qui pourraient participer à la genèse et la propagation d'une crise (Steinhäuser *et al.* 2012). En effet, ces anomalies précèdent la perte neuronale. Encore une fois, l'origine des altérations astrocytaires pourraient être une conséquence de l'inflammation ou le résultat d'une atteinte cérébrale primitive.

b. Une dérégulation microgliale

Comme dans les pathologies chroniques du SNC autres que la SEP, les cellules microgliales ne parviennent pas à restaurer l'homéostasie tissulaire et maintiennent une **inflammation chronique dans la SEP** (Murray & Wynn 2012). Leurs réponses deviennent disproportionnées ou aberrantes, contribuant alors à l'atteinte tissulaire et perpétuant la réponse inflammatoire. En plus de toutes les fonctions délétères que nous avons pu décrire dans l'établissement du phénotype M1 des cellules microgliales, nous nous intéresserons, ici, à une caractéristique de la réponse microgliale dans la SEP : la formation de nodules microgliaux.

Formation des nodules microgliaux

Les **nodules microgliaux** ont d'abord été observés en réponse au virus de la Rage puis dans les formes neurologiques du SIDA (Syndrome d'immunodéficience acquise) (Kato *et al.* 1987; Nebuloni *et al.* 2000), et enfin, récemment dans la SBAN des patients SEP (Fig. 38A) (Prineas *et al.* 2001; Barnett *et al.* 2009a). On a donc pensé qu'il pouvait s'agir d'une forme de **réponse anti-virale** ou d'une **réaction microgliale spécifique** de ces pathologies pouvant être utilisée comme marqueur biologique. En effet, des nodules sont également décrits dans d'autres infections virales : par le cytomégalovirus (Variend *et al.* 1997), par le virus West Nile (Bosanko *et al.* 2003), ou encore par le virus de la Dengue (Falconar & Martinez 2011). Dans 70% des patients SEP (van 120

Horssen *et al.* 2012), les cellules microgliales activées forment de petits nodules allongés, présents principalement dans la SBAN, à proximité des plaques actives ou au sein des plaques inactives (Prineas *et al.* 2001; Barnett *et al.* 2009a; van Noort *et al.* 2011). Ces nodules microgliaux sont caractérisés par un **dépôt de complément activé** (fragment C3d) et entourent souvent des **axones partiellement démyélinisés** (Prineas *et al.* 2001; Barnett *et al.* 2009a).

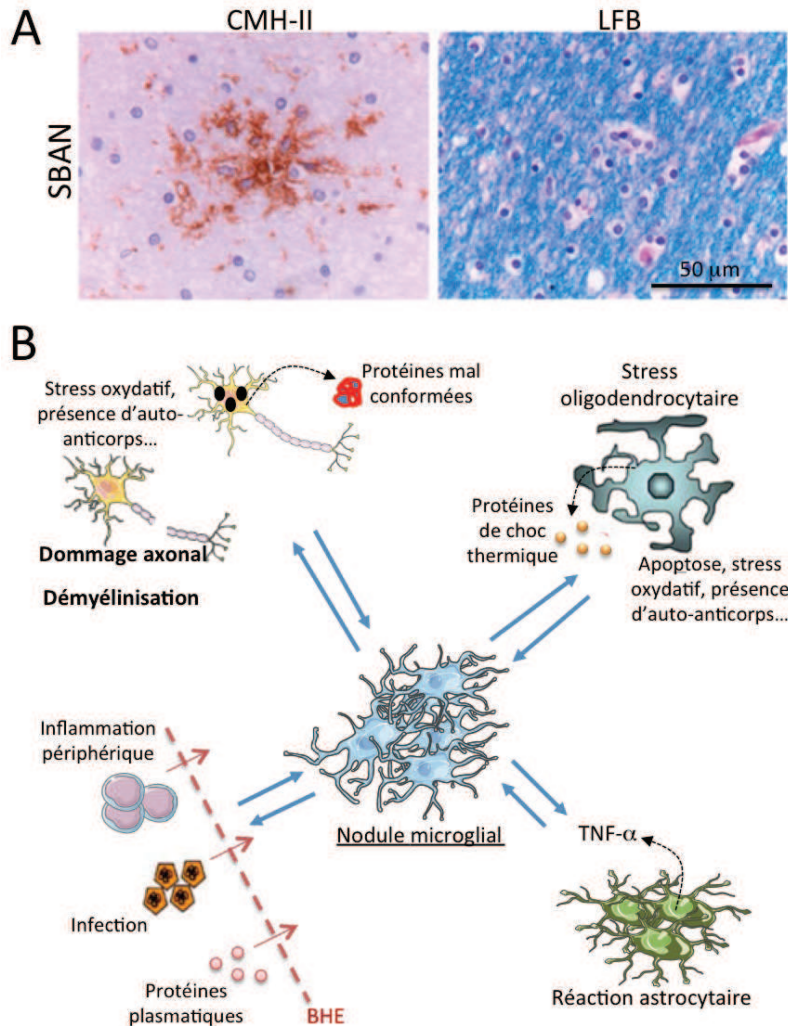


Figure 38 : Les nodules microgliaux dans la SEP (figures adaptées de van Noort *et al.* 2011). **A.** Observation d'un nodule microglial positif pour le marqueur d'activation CMH-II au sein de la SBAN après une coloration de la myéline (LFB⁺). **B.** Hypothèses de formation et du rôle pathogénique des nodules microgliaux dans la SEP.

On ne sait pas réellement comment les nodules microgliaux se forment. Ils pourraient résulter de l'**attraction** réciproque des cellules microgliales activées ou bien de la **prolifération** locale d'une cellule microgliale exacerbée. Dans un modèle murin de lésion axonale, la formation de clusters microgliaux est issue de la prolifération intense des cellules microgliales qui expriment alors des marqueurs de cellules souches dont CD34 (Dissing-Olesen *et al.* 2007). Dans un modèle d'infection virale de macaques, des cellules microgliales activées CMH II⁺ se regroupent autour des neurones apoptotiques (Berman *et al.* 1998). La durée de formation des nodules n'est pas claire, de quelques jours à quelques semaines (Bohatschek *et al.* 2004). On se demande aussi si, au sein d'un

nodule, les cellules sont fusionnées entre elles. Dans les encéphalites virales, les nodules microgliaux semblent se distinguer des cellules multi-nucléées géantes également présentes (Nebuloni *et al.* 2000). Mais dans d'autres modèles, les cellules microgliales fusionnent pour former des nodules, signe d'une activation anormale (Fendrick *et al.* 2007). Une dernière hypothèse de formation est le regroupement de **cellules microgliales en dégénérescence** suggéré dans un modèle murin de SLA (Fendrick *et al.* 2007).

Les nodules microgliaux, des lésions pré-actives ?

Le rôle pathogénique des nodules microgliaux dans la SEP n'est pas fermement établi (Fig. 38B). Pour sûr, il représente, pour les cellules voisines, une **source locale** de toutes les cytokines pro-inflammatoires et des substances toxiques produites. Le dépôt de complément activé avait suggéré que les nodules formaient un espace privilégié de **présentation antigénique** (Barnett *et al.* 2009a). En effet, au sein des nodules, les cellules microgliales activées sont CMH II⁺ et CMH I⁺ et forment des synapses immunologiques (Bohatschek *et al.* 2004). Des inclusions de myéline (LFB⁺) ont été observées, signe d'une **activité phagocytaire** (Prineas *et al.* 2001; Barnett *et al.* 2009a) et une production de métallo-protéinases impliquées dans la destruction tissulaire (Maeda & Sobel 1996).

Dans la SEP, les nodules microgliaux sont souvent considérés comme des **lésions pré-actives** parce qu'ils pourraient être à l'origine de nouvelles lésions (van Noort *et al.* 2011; van Horssen *et al.* 2012). Néanmoins, les nodules microgliaux sont le plus souvent observés en absence d'infiltration lymphocytaire et de rupture de la BHE, de réaction astrocytaire et de démyélinisation (van Noort *et al.* 2011; van Horssen *et al.* 2012). Ils pourraient donc représenter un **stade réversible** de l'initiation d'une lésion. En effet, leur fréquence élevée suggère que tous les nodules ne progressent pas vers une lésion de démyélinisation mais sont le plus souvent résorbés par des mécanismes protecteurs (van Noort *et al.* 2011). En ce sens, ils expriment à la fois des signaux pro-inflammatoires et anti-inflammatoires (IL-10 et TNF- α) (van Horssen *et al.* 2012). Cette équipe n'a pas confirmé l'expression des métallo-protéinases par les nodules microgliaux mais l'expression forte des sous-unités de NOX2 (NADPH oxydase 2) impliquée dans le stress oxydatif. L'absence de rupture de la BHE appuie également la nature intrinsèque au SNC du *stimulus* induisant les nodules microgliaux (van Horssen *et al.* 2012). Il pourrait s'agir d'un stress oligodendrocytaire libérant de petites protéines de choc thermique suffisantes pour activer les cellules microgliales. Une dernière étude a montré que les nodules microgliaux se forment, dès les stades précoces de la maladie, préférentiellement **autour des axones altérés ou dégénératifs** dans le cadre de la dégénérescence Wallérienne (Singh *et al.* 2013).

3) L'atteinte neuronale par les cellules gliales

a. En conséquence de l'atteinte oligodendrocytaire

Outre l'atteinte neuronale intrinsèque au neurone, nous avons vu que la perte de myéline est à l'origine de nombreux dysfonctionnements neuronaux (Fig. 22). Nous avons décrit ces deux points en première partie. En effet, les oligodendrocytes altérés n'assurent plus leur fonction primordiale d'**isolant électrique** et leur **soutien trophique** au neurone (Nave & Trapp 2008; Dutta & Trapp 2011). Les relations physiques et biochimiques qui assurent le couplage oligodendrocyte-neurone se détériorent progressivement. La demande énergétique des axones dénudés devient trop importante pour les pompes ioniques pouvant être à l'origine d'une dégénérescence mitochondriale (Stys 2005). Le transport ionique n'est plus suffisamment assuré par les pompes Na^+/K^+ conduisant à une mauvaise propagation du potentiel d'action le long de l'axone. L'axone est alors en état d'hypoxie pouvant mener à sa dégénérescence. Un autre exemple que nous n'avons pas évoqué est la perte de l'apport de polyribosomes par l'oligodendrocytes, montré dans le SNP (Court *et al.* 2008; Stys *et al.* 2012). Sans ce mécanisme sensé permettre à l'axone de synthétiser sur place des protéines sans avoir recours au long transport axonal demandeur en énergie, l'axone ne renouvellerait pas efficacement ses protéines.

b. En conséquence des perturbations astrocytaires

De la même façon, les altérations fonctionnelles des astrocytes, décrites dans cette partie, ont des conséquences directes sur les neurones. On parle d'effet « bystander ». Une littérature concernant les altérations astrocytaires dans la SEP commence à émerger. Le moindre changement moléculaire de l'astrocyte est susceptible d'affecter son soutien au fonctionnement neuronal (Hamby & Sofroniew 2010). Des **changements astrocytaires précoces**, contribuant au **dommage axonal**, ont été montré dans l'EAE (Wang *et al.* 2005 glia).

Premier exemple, la propagation des potentiels d'action le long de l'axone nécessite la **clairance du K^+** par les astrocytes notamment via le canal potassique **Kir4.1**. Cette nouvelle cible antigénique de la SEP est probablement dérégulée par la présence d'auto-anticorps (Srivastava *et al.* 2012). Dans le modèle de démyélinisation induite par le Cuprizone, on observe une accumulation du canal Kir4.1 (Nakajima *et al.* 2013). La stabilité du potentiel membranaire de l'axone n'est alors probablement pas assurée.

Concernant le soutien de la **transmission synaptique**, les neurones sont sensibles à l'excès de neurotransmetteurs normalement recyclés par les astrocytes afin de réduire leur potentiel excitotoxique. Par exemple, dans les lésions de SEP, les astrocytes réactifs sont équipés des

molécules nécessaires à la capture du glutamate. Ils expriment le récepteur au glutamate GluR3 AMPA, le récepteur métabotropique GluR1, les transporteurs de glutamate GLT-1 et GLAST et des enzymes du métabolisme du glutamate (Newcombe *et al.* 2008). La perturbation de l'expression de ces molécules augmenterait le risque d'**excitotoxicité du glutamate**. Le glutamate pourrait notamment provoquer l'activation chronique des récepteurs NMDA des axones, soutenue par une perturbation de l'homéostasie du cuivre (Stys *et al.* 2012).

De part la dérégulation de l'expression de leurs connexines, la **perte du couplage des astrocytes** est décisive dans la SEP (Markoullis *et al.* 2012). Elle a une incidence sur la clairance du K^+ , la capture des neurotransmetteurs et la propagation des vagues calciques qui soutiennent la plupart des fonctions du réseau astrocytaire, notamment la production de glio-transmetteurs (Brand-Schieber *et al.* 2005; Hamby & Sofroniew 2010). Ces changements et leurs conséquences ont été étudiés dans l'EAE montrant une plus forte excitotoxicité du glutamate (Pitt *et al.* 2000).

Dans la SEP, l'expression des enzymes astrocytaires est également perturbées par le **stress oxydatif**, participant à son amplification. Sous l'effets de cytokines pro-inflammatoires, les astrocytes réactifs induisent l'expression de iNOS2 et donc la production de NO, toxique pour le neurone, ainsi que l'expression de SOD et de COX2 (cyclooxygénase 2), délétères lorsqu'elles sont trop fortement exprimées (Hamby & Sofroniew 2010). De même, la production de glutathion par les astrocytes, sensée réguler le stress oxydatif, est perturbée en conditions inflammatoires (Fig. 29 ; cycle vert).

Un dernier exemple est la perturbation du fonctionnement du **récepteur neurotrophique TrkB**. Son expression et celles de ces ligands, des neurotrophines ou le BDNF, ont été montré au sein des lésions SEP (Stadelmann *et al.* 2002). Son activation sur les astrocytes pourrait supporter la dégénérescence neuronale chez les patients (Colombo *et al.* 2012).

c. En conséquences des perturbations microgliales

Nous avons vu, dans le cadre de la SEP, que l'activité délétère des cellules microgliales était principalement dirigée contre la myéline. Des effets plus ou moins directs sur les neurones ont également été démontrés (Stadelmann *et al.* 2011). Lorsque les cellules microgliales sont recrutées au niveau des débris axonaux, elles produisent des **substances toxiques** pour les axones, notamment lors de la phagocytose des débris myélinique (Brück *et al.* 1995, 1996). Plus précisément, une équipe a montré une corrélation entre l'activation microgliale, l'expression de neurofilaments non phosphorylés et l'altération de l'organisation paranodale de l'axone dans la SBAN et dans l'EAE (Howell *et al.* 2010). Les changements observés sont indépendents de la démyélinisation et apparaissent avant les signes cliniques dans l'EAE. L'inhibition de l'activation microgliale par la Minocycline a donc permis de préserver l'intégrité axonale dans ce modèle.

Grâce aux nouvelles techniques d'observation, des cellules microgliales ont pu être observées *in vivo* en train de phagocyter des axones vivants chez des animaux EAE (Davalos *et al.* 2012). Cet argument suggère l'implication directe des cellules microgliales dans la destruction axonale. La **phagocytose de débris axonaux** a été observée dans des cellules microgliales CMH II⁺ à proximité d'une atteinte axonale (Huizinga *et al.* 2012). La dégradation de ces débris pourrait amplifier la réponse auto-immune contre des antigènes neuronaux via leur présentation dans le SNC ou leur circulation dans le LCR des patients. L'association des nodules microgliaux et des neurones dégénératifs supporte l'implication des cellules microgliales dans l'atteinte axonale liée à la SEP (Singh *et al.* 2013). Des nodules microgliaux se forment effectivement autour de neurones endommagés dans des modèles animaux de lésion axonale (Möller *et al.* 1996; Werner *et al.* 1998; Raivich *et al.* 1998; Bohatschek *et al.* 2004). Enfin, comme les astrocytes, la microglie soutient l'activité neuronale. La perturbation de l'expression des récepteurs et des enzymes du métabolisme est susceptible d'altérer cette fonction (Newcombe *et al.* 2008). Par exemple, dans les lésions actives de SEP, les cellules microgliales expriment fortement la glutaminase à proximité des axones altérés, contribuant à la production toxique de glutamate (Werner *et al.* 2001).

On comprend donc mieux pourquoi il est difficile de freiner le cercle délétère dans lequel sont entraînées les cellules gliales au cours de la SEP. Quelque soit l'événement déclenchant une atteinte cellulaire, les altérations gliales ont des conséquences sur le fonctionnement du SNC, amplifiant l'atteinte neuronale. En retour, l'atteinte neuronale participe à l'activation gliale créant un impossible retour en arrière.

D/ Réparation tissulaire dans la SEP : le rôle des cellules gliales

1) Des acteurs de la réparation tissulaire dans le SNC

a. Les mécanismes de remyélinisation

Nous avons précédemment rappelé la présence de plaques de remyélinisation sur les tissus autopsiés. Quels peuvent être les mécanismes de remyélinisation mis en jeu (Franklin & Ffrench-Constant 2008) ? Le processus de remyélinisation avait d'abord été observé dans un modèle de démyélinisation induite chez le rat, quelques années avant **Perrier et Grégoire** chez les patients

SEP (Bunge *et al.* 1961). Il semble que plusieurs types cellulaires participent à la remyélinisation dans la SEP. Les **cellules précurseurs d'oligodendrocytes (OPC)**, qui représentent 5 à 8% des cellules du SNC, réparties de façon homogène, sont les contributeurs majoritaires (Parras *et al.* 2007). Les lésions péri-ventriculaires seraient davantage remyélinisées par les **cellules progénitrices de la zone sous-ventriculaire** (Mecha *et al.* 2013) et les lésions en bordure de la moelle épinière, par les **cellules de Schwann** périphériques P_0^+ (Black *et al.* 2006).

A proximité d'une lésion SEP, les OPC quiescents sont d'abord activés et acquièrent le facteur de transcription **Olig-2** (Fig. 39). Des facteurs de croissance, tels **PDGF** et **FGF**, favorisent leur prolifération. Les précurseurs sont ensuite recrutés dans la lésion par des signaux attractifs comme les sémaphorines, mieux connus dans le guidage axonal. Les OPC se différencient ensuite en oligodendrocytes matures jusqu'à produire une gaine de myéline compactée. Si la gaine de myéline nouvellement formée est **plus fine** à l'observation (Fig. 8B), une remyélinisation complète restaure toutefois sa fonctionnalité (Smith *et al.* 1981). Les axones remyélinisés sont également reconnaissables par leur plus forte densité mitochondriale (Zambonin *et al.* 2011). Enfin, les plaques de remyélinisation sont d'une part moins touchées par l'atteinte axonale aiguë (Kornek *et al.* 2000) mais aussi par la dégénérescence axonale secondaire à la démyélinisation (Irvine & Blakemore 2008).

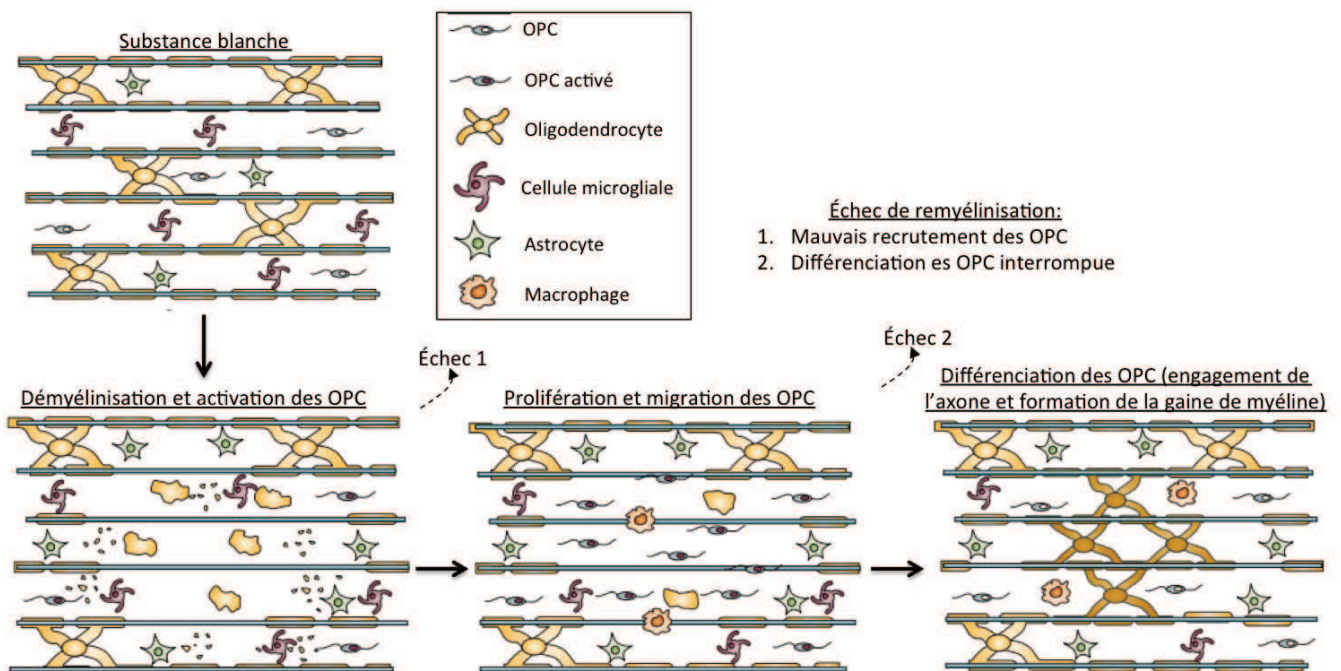


Figure 39 : La remyélinisation dans la SEP (d'après Franklin & Ffrench-Constant 2008).

b. Le rôle protecteur des cellules microgliales et des macrophages : un profil M2 en faveur de la remyélinisation

A l'opposé des fonctions destructrices décrites précédemment, les cellules microgliales et les macrophages seraient capables de favoriser la **remyélinisation** et la **régénérescence axonale** dans la SEP (Fig. 40) (Napoli & Neumann 2010). En effet, l'inactivation de la microglie par la Minocycline suite à la démyélinisation induite par le Cuprizone a montré une réduction de la remyélinisation via la suppression de l'expression du CNTF (Ciliary neurotrophic factor) (Tanaka *et al.* 2013).

On connaît l'importance de la **phagocytose des débris myéliniques et axonaux** dans la réparation tissulaire. Même chez les invertébrés, la phagocytose des débris cellulaires favorise la régénérescence neuronale (Napoli & Neumann 2010). Dans le SNC, la capacité des cellules microgliales à nettoyer les débris myéliniques serait moindre et nécessiterait le soutien des macrophages recrutés (Stoll & Jander 1999; Popovich *et al.* 1999; Vargas & Barres 2007). Cette fonction est primordiale pour créer un environnement favorable à la réparation cellulaire, notamment parce que les débris de myéline contiennent des **inhibiteurs de croissance**, comme **Nogo A**, réduisant la croissance axonale (David & Lacroix 2003). Au sein des lésions SEP, le rôle de la phagocytose est ambigu. L'activité phagocytaire caractérise les lésions actives mais elle continue également au bord des lésions chroniques actives où elle pourrait soutenir la remyélinisation. Des macrophages sont effectivement présents, mais dispersés dans les lésions complètement remyélinisées (Lucchinetti *et al.* 1999). Dans un modèle EAE, deux équipes ont montré le rôle bénéfique de la phagocytose médiée par le récepteur **TREM2** et une des molécules associées à sa signalisation, DAP12 (DNAX-activating protein 12) (Neumann & Takahashi 2007; Takahashi *et al.* 2007; Piccio *et al.* 2007). Ce récepteur est fortement exprimé par les cellules microgliales pendant l'EAE. *In vitro*, sa signalisation augmente le nettoyage des débris cellulaires (Takahashi *et al.* 2005). Enfin, la transplantation de cellules myéloïdes sur-exprimant TREM2 favoriserait le nettoyage des débris, la mise en place d'un profil anti-inflammatoire et la guérison pendant l'EAE (Takahashi *et al.* 2007).

Plusieurs études ont cherché à identifier le phénotype microglial capable de favoriser la remyélinisation, notamment après la démyélinisation induite par le Cuprizone (Voss *et al.* 2012; Olah *et al.* 2012). Ces cellules sont capables de phagocyter les débris myéliniques et les cellules apoptotiques pendant la démyélinisation. Elles participent à la création d'un **environnement favorable à la régénérescence** en sécrétant des cytokines anti-inflammatoires (IL-4, IL-10 et TGF-

β), des chimiokines et des facteurs solubles qui favorisent la réparation neuronale, activent et recrutent les OPC endogènes, et supportent la différenciation oligodendrocytaire (IGF-1 : Insulin-like growth factor 1 ; BDNF : *Brain-derived neurotrophic factor*). Les cellules microgliales sont attirées par des *stimuli* protecteurs des neurones, comme la fractalkine, reconnue par le récepteur microglial CX3CR1 (Cardona *et al.* 2006). Elles participent également au **recrutement de nouvelles cellules souches**. En effet, on a d'abord cru que la microglie inhibait la neurogénèse mais cela dépendrait du phénotype observé (Monje *et al.* 2003). Le phénotype protecteur favoriserait l'**oligodendrogénèse** mais aussi la **neurogénèse** (Kotter *et al.* 2006; Nikolakopoulou *et al.* 2013). Ces cellules microgliales et les macrophages recrutés seraient donc polarisés vers des **fonctions M2** (Mikita *et al.* 2011; Voss *et al.* 2012; Olah *et al.* 2012; Miron *et al.* 2013). Ils induiraient la différenciation des LT vers la voie protectrice Th2 ou des LT régulateurs (Moalem *et al.* 2000; Butovsky *et al.* 2006). La transplantation de cellules polarisées M2 permet d'ailleurs de réduire la sévérité de l'EAE (Mikita *et al.* 2011). En réalité, la situation est plus complexe car des cytokines pro-inflammatoires, comme le TNF- α ou l'IL-1 β , ont aussi été montrées comme nécessaires à la remyélinisation (Arnett *et al.* 2001). Le rôle individuel de chaque molécule doit être analysé avec précaution car il dépend de la dose et du contexte local. Néanmoins, l'enjeu thérapeutique est aujourd'hui de **favoriser un profil réparateur des cellules microgliales** et des macrophages. Les molécules exprimées spécifiquement par les cellules gliales, comme le transporteur TSPO (Translocator protein), sont des cibles thérapeutiques potentielles. L'Etifoxine, un ligand du TSPO, a montré son effet bénéfique sur l'EAE et pourrait être utilisé dans la SEP (Daugherty *et al.* 2013).

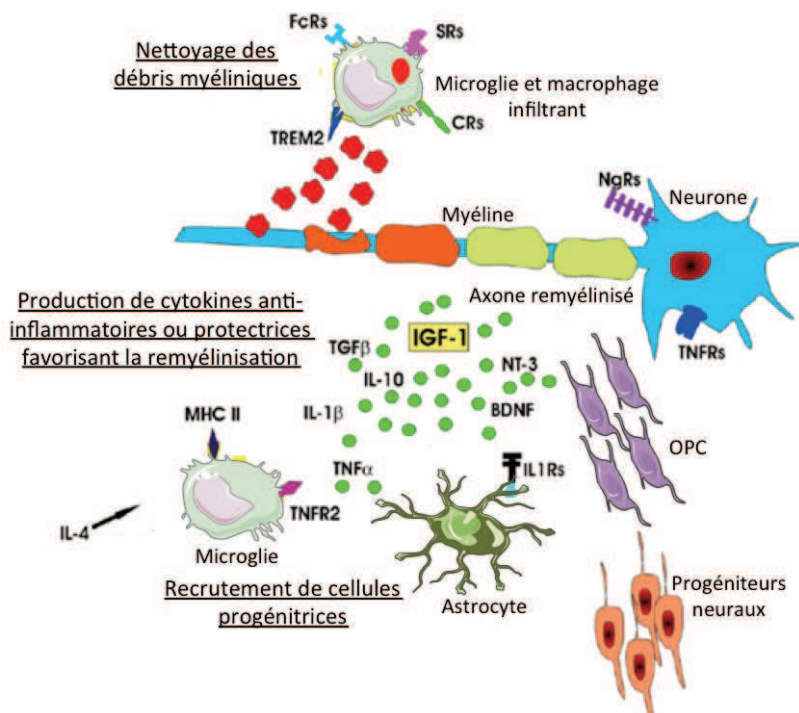


Figure 40 : Rôles protecteurs des cellules microgliales et des macrophages dans la SEP (figure adaptée de Napoli & Neumann 2010). CR : Récepteurs du complément ; TNFR2 : Récepteur 2 du TNF ; NgRs : Récepteur de Nogo-1 ; NT3 : Neurotrophine 3.

c. Le rôle protecteur des astrocytes

Comme les cellules microgliales, les astrocytes sont capables de favoriser la réparation tissulaire et notamment la **remyélinisation** (Fig. 41) (Williams *et al.* 2007; Lundgaard *et al.* 2014). Ils sont neuro-protecteurs par nature. L'ablation spécifique des astrocytes, le plus souvent délétère, démontre l'importance de leurs fonctions protectrices (Bush *et al.* 1999; Faulkner *et al.* 2004). Dans l'EAE, l'ablation des astrocytes augmente la propagation de l'inflammation et l'atteinte tissulaire (Voskuhl *et al.* 2009).

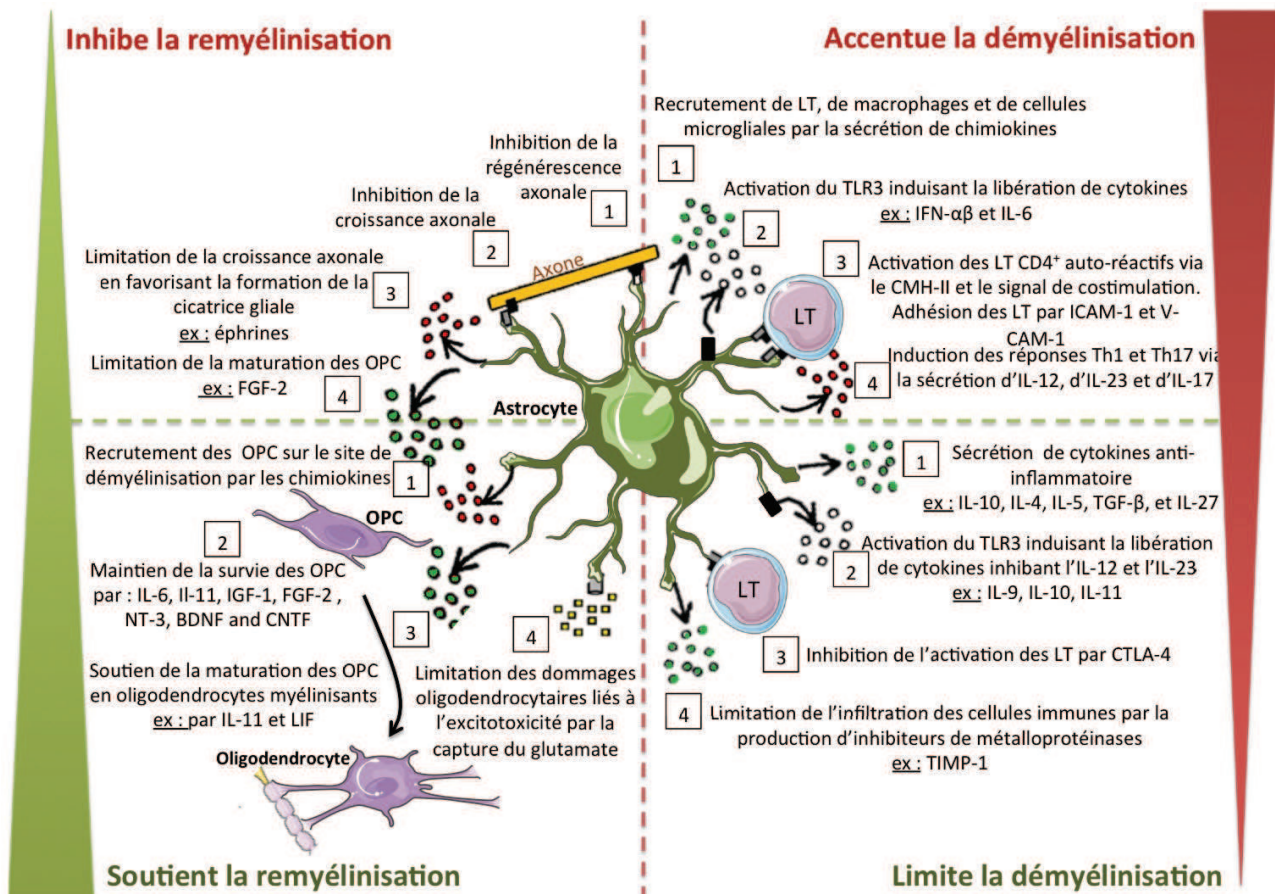


Figure 41 : Le rôle dualiste des astrocytes dans la SEP (figure adaptée de Nair *et al.* 2008).

Une étude a montré que la transplantation d'astrocytes dans une lésion de démyélinisation favorisait la remyélinisation par les OPC endogènes (Franklin *et al.* 1991). Ils favoriseraient la phagocytose des débris myéliniques notamment à travers le **recrutement des cellules microgliales** (Skripuletz *et al.* 2013; Lundgaard *et al.* 2014). En effet, les astrocytes, comme les neurones, sécrètent la **fractalkine** (CX3CL1) attirant les cellules microgliales protectrices (Cardona *et al.* 2006). Ils sécrètent aussi des **cytokines anti-inflammatoires** maintenant le phénotype M2 des cellules microgliales (Farina *et al.* 2007). Les astrocytes pourraient participer au recrutement direct des oligodendrocytes et favoriser ainsi la remyélinisation. En effet, les astrocytes réactifs de la SEP expriment CXCL1 reconnu par le récepteur CXCR2 des oligodendrocytes (Omari *et al.* 2006). A

l'instar du développement, les **facteurs trophiques** sécrétés par les astrocytes sont susceptibles de favoriser la remyélinisation (Barnett & Lington 2012). Par analogie avec les processus de myélinisation, on suppose que les astrocytes sont nécessaires à la survie des précurseurs oligodendrocytaires puis au maintien des nouvelles gaines de myéline. Notamment, ils maintiennent l'homéostasie du fer vitale pour les oligodendrocytes et leur capacité remyélinisante (Lundgaard *et al.* 2014).

2) Pourquoi la remyélinisation échoue-t-elle dans la SEP ?

Bien que la récupération soit associée à des phases de remyélinisation chez les patients, il semble que les **processus de remyélinisation s'atténuent avec le temps**. Le niveau de remyélinisation reste limité dans la SEP. On peut se demander pourquoi la remyélinisation n'arrive pas à son terme dans certaines lésions et au fil du temps. L'absence de remyélinisation est corrélée à des formes plus sévères de la SEP, en particulier dans les formes progressives (Bramow *et al.* 2010). Depuis longtemps, on sait que l'installation de la démyélinisation chronique, dans le modèle Cuprizone, instaure un défaut de remyélinisation (Ludwin 1978). L'**échec de la remyélinisation** peut être dû à un défaut de l'une des étapes de la remyélinisation (Fig. 39). L'environnement doit d'abord être favorable. Or, dans la SEP, le nettoyage des débris myéliniques, **pré-requis à la remyélinisation**, est souvent lent et incomplet, probablement insuffisant (Vargas & Barres 2007). L'amplification de l'atteinte tissulaire et de l'inflammation favorise, au fil des années, le passage des cellules microgliales d'un **phénotype M2 vers un phénotype M1** pro-inflammatoire (Mikita *et al.* 2011), voir des phénotypes intermédiaires (Vogel *et al.* 2013). Les débris de myéline restant inhibent non seulement la régénérescence axonale mais aussi la remyélinisation (Kotter *et al.* 2006). Ils stopperaient la différenciation des oligodendrocytes. Pour que la remyélinisation soit un succès, l'activation, le recrutement puis la différenciation des OPC doivent se passer sans encombre. La cicatrice gliale est supposée créer un environnement hostile au lignage oligodendrocytaire (Holley *et al.* 2003). En effet, les altérations astrocytaires observées dans la SEP, et notamment la perte du couplage astrocyte-oligodendrocyte, sont susceptibles d'empêcher une remyélinisation efficace, les astrocytes ne pouvant pas assurer la survie des oligodendrocytes (Markoullis *et al.* 2012). Dans cette étude, les OPC à proximité des lésions SEP semblent faiblement connectés aux astrocytes.

3) Les thérapies régénératives

Afin de remédier à cet échec, favoriser ou induire la remyélinisation chez les patients fait partie des promesses thérapeutiques du futur. Deux stratégies sont envisageables (Franklin & Ffrench-Constant 2008). D'une part, **induire la remyélinisation endogène** utiliserait le potentiel

pré-existant. Chaque étape des mécanismes de remyélinisation doit être optimisée pour que la réparation soit un succès : activation, recrutement, maturation et différenciation des OPC. Les projets sont nombreux et nous ne citerons que quelques exemples. Bloquer des molécules répulsives ou fournir des molécules de guidage type sémaphorines ou nétrines favoriseraient le recrutement des OPC (Piaton *et al.* 2011). Des voies de signalisation comme la voie Wnt et β -caténine (Xie *et al.* 2013) ou des molécules comme Lingo-1 ont été identifiées inhibitrices de la différenciation des oligodendrocytes. Un anticorps bloquant dirigé contre Lingo-1 est actuellement en essai clinique afin de lever de telles inhibitions (Mi *et al.* 2013). Des accélérateurs comme l'olesoxime (Magalon *et al.* 2012) ou des agonistes du récepteur nucléaire RXR γ (Huang *et al.* 2011) favoriseraient directement la différenciation des OPC.

D'autre part, des stratégies de remyélinisation sont envisagées par **transplantation de cellules exogènes** (Franklin & Ffrench-Constant 2008). Les cellules souches hématopoïétiques de la moelle osseuse n'ont donné aucun résultat. Les cellules de Schwann du SNP migrent facilement mais leur entrée dans le SNC reste trop limitée. Les cellules stromales mésenchymateuses de la moelle osseuse n'ont pas non plus montré de résultats encourageant si ce n'est un effet trophique indirect sur les cellules du SNC. Les deux dernières tentatives ont, elles, atteint l'approche pré-clinique. En effet, les essais d'injection intracérébrale ou systémique de cellules souches neurales sur les modèles EAE ont montré qu'elles étaient capables de se différencier en neurones et cellules gliales après avoir rejoint les sites lésionnels jusqu'à l'amélioration fonctionnelle (Yang *et al.* 2012b). En réalité, il n'est pas encore certain qu'il s'agisse véritablement d'une remyélinisation endogène mais plutôt du maintien d'un milieu immuno-modulateur. Enfin, un essai prometteur a consisté à injecter des cellules des capsules frontales dans des souris *shiverer* complètement démyélinisées. Ces cellules, issues des crêtes neurales, se situent à la frontière du SNC et du SNP et sont accessibles le long des racines sensitives et motrices. Des gaines de myéline normales se sont effectivement formées à l'issue de la greffe (Zujovic *et al.* 2011).

QUESTIONS CLES - OBJECTIFS

L'implication des macrophages/cellules microgliales est clairement établie dans les processus de démyélinisation et d'atteinte neuronale à l'origine des signes cliniques de la SEP. Cependant, certaines questions restent à résoudre afin de mieux comprendre leur cinétique d'intervention au cours de la maladie et leur plasticité d'activation en fonction de la localisation des lésions et du stade évolutif de la maladie. Dans ce cadre, ce travail de thèse a pour but de caractériser, au plan moléculaire, la réaction macrophagique/microgliale dans la SEP. Nous avons particulièrement ciblé les formes progressives.

✓ Ci-dessous sont les questions majeures qui ont porté ce travail :

Existe-t-il une spécificité des lésions de la moelle épinière dans les formes progressives de la SEP ? Connaissant l'impact décisif des lésions de la moelle épinière sur le développement des atteintes neurologiques chroniques et irréversibles, nous avons choisi de travailler sur des prélèvements autopsiques de moelle épinière dérivant de patients SEP à forme progressive très bien caractérisés. Le matériel étudié a été obtenu en étroite collaboration avec l'Imperial College de Londres et le Professeur Richard Reynolds.

La question de la spécificité des lésions de la moelle épinière s'inscrit dans une logique du suivi clinique des patients. En effet, les lésions médullaires détectées en IRM sont maintenant incluses dans les critères diagnostiques de la SEP. Il convient donc de déterminer les substrats tissulaires et cellulaires aux lésions détectées. En retour, la compréhension des nouvelles techniques de détection IRM appliquées à la moelle ne pourra en être qu'améliorée.

Quels sont les profils macrophagiques et microgliaux qui soutiennent la gravité des atteintes tissulaires dans les formes progressives de la SEP :

1. Au niveau des lésions médullaires ?

2. Au niveau des lésions corticales ?

L'atteinte médullaire et l'étendue de la démyélinisation corticale sont effectivement plus sévères dans les formes progressives que dans les formes rémittentes. Les lésions médullaires et les lésions corticales sont impliquées dans le handicap progressif et irréversible des patients. Nous avons cherché à comprendre la réponse macrophagique/microgliale qui soutient les mécanismes lésionnels dans ces deux contextes inflammatoires.

Comment identifier des profils d'activation spécifique d'un type cellulaire dans un contexte pathologique ? Sur le plan méthodologique, nous nous sommes interrogés sur la façon d'identifier, au sein d'une population cellulaire hétérogène, des profils d'activation spécifiquement macrophagiques/microgliaux. Des profils d'activation ont été identifiés *in vitro* dans des cultures cellulaires, à partir de lignées cellulaires ou de cellules dérivées de patients. Cependant, même dans ce dernier cas, les cellules sont sorties de leur contexte lésionnel. Nous présentons, dans cette thèse, deux méthodologies complémentaires qui nous ont aidés à identifier, chez des patients SEP, des profils d'activation macrophagique/microgliale au sein des lésions de la moelle épinière et des lésions corticales.

L'activation macrophagique/microgliale dans les formes progressives de la SEP est-elle différente de celles des autres pathologies chroniques du SNC? Enfin, nous nous sommes demandés si les profils d'activation macrophagique/microgliale identifiés dans la SEP étaient spécifiques de lésions étudiées ou bien s'ils présentaient des similitudes avec les profils d'activation impliqués dans d'autres contextes neuro-inflammatoires et/ou neuro-dégénératifs.

✓ Afin d'apporter des éléments de réponse, nous avons réalisé des analyses histologiques et moléculaires à partir de **tissus humains *post-mortem* de patients atteints de formes progressives de la SEP**. Nos objectifs ont été les suivants :

1. Identifier les caractéristiques histologiques et moléculaires des **lésions de démyélinisation des périplaques (LDP) au sein de la moelle épinière**.
2. Identifier **le contexte inflammatoire et les mécanismes immunitaires innés impliqués dans la formation des LDP** afin d'établir une cartographie morpho-fonctionnelle de l'activation macrophagique/microgliale dans la moelle épinière.
3. Développer une **méthode de microdissection virtuelle des données transcriptomiques** afin d'identifier des profils d'activation macrophagique/microgliale sur des tissus autopsiques.
4. Identifier les programmes d'activation macrophagique/microgliale impliquée dans les **lésions de démyélinisation corticales**.
5. Comparer les réponses macrophagiques/microgliales identifiées dans la SEP à celles identifiées dans des **contextes neuro-dégénératifs et/ou neuro-inflammatoires liés à différentes pathologies chroniques du SNC** : la sclérose latérale amyotrophique, la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington et la schizophrénie. L'identification de molécules clés supportant l'activation macrophagique/microgliale pourrait servir de base à la conception de nouvelles approches thérapeutiques ciblant spécifiquement le lignage macrophagique/microgliale dans un contexte neuro-inflammatoire.

RESULTATS

I. Activation macrophagique/microgliale spécifique des périplaques lésionnelles de la moelle épinière des patients SEP : un nouvel aspect de la démyélinisation

A/ Contexte du travail

Les plaques de démyélinisation de la SEP ont été largement caractérisées. De nature inflammatoire, elles sont traditionnellement classifiées en fonction de la présence et de la distribution des macrophages infiltrant et cellules microgliales activées selon trois types : actives, chronique actives ou chroniques inactives (Charcot 1865; Ferguson *et al.* 1997; Trapp *et al.* 1998; Lassmann *et al.* 2007). On sait très bien maintenant que les altérations tissulaires de la SEP ne sont pas limitées à ces lésions focalisées mais qu'il existe des altérations diffuses non négligeables au sein de la SBAN des patients (Lovas *et al.* 2000; Kutzelnigg *et al.* 2005; Zeis *et al.* 2008a; Howell *et al.* 2010; Androdias *et al.* 2010). Il s'agit d'une part de la perte axonale diffuse, aujourd'hui considérée comme la cause majeure du handicap irréversible (Confavreux *et al.* 2000, 2003; Bjartmar *et al.* 2000; Miller *et al.* 2003; Kutzelnigg *et al.* 2005) et d'autre part, d'un processus inflammatoire diffus qui se manifeste aussi bien dans le cerveau que dans la moelle épinière (Kutzelnigg *et al.* 2005; Frischer *et al.* 2009; Howell *et al.* 2010; Androdias *et al.* 2010). Cependant, peu d'auteurs se sont vraiment intéressés, jusqu'à présent, à la bordure des plaques, que l'on qualifie généralement de périplaque. Cette zone, correspondant à une bande de tissu d'épaisseur variable entre la plaque et la SBAN adjacente, apparaît de nature intermédiaire. Une étude approfondie de la périplaque pourrait vraisemblablement nous apporter des informations cruciales sur les mécanismes cellulaires d'extension des plaques ou de réparation tissulaire. En effet, si tous les acteurs cellulaires ne sont plus présents au sein des plaques démyélinisées, ils le sont toujours dans la périplaque qui apparaît alors comme le théâtre privilégié des interactions cellulaires à identifier. Si plusieurs études se sont intéressées aux processus de remyélinisation active que l'on peut observer au bord des plaques (Prineas & Connell 1979; Brück *et al.* 2003; Patrikios *et al.* 2006; Henderson *et al.* 2009), les zones de démyélinisation incomplètes, qui semblent correspondre à la majorité des périplaques, n'ont pas été véritablement caractérisées histologiquement (Nijeholt *et al.* 2001). En effet, les nouvelles séquences d'analyse IRM ont bien permis de détecter des altérations de la périplaque dans la SB (Ropele *et al.* 2000; Ge *et al.* 2003; Moore *et al.* 2008; Seewann *et al.* 2009; Filippi & Rocca 2010; Vrenken *et al.* 2010). Les signaux IRM détectés sont de nature intermédiaire entre les plaques et la SBAN mais la nature des altérations associées est encore contestée (Zhang *et al.* 2013a).

Dans ce contexte, notre étude avait pour but d'identifier les caractéristiques histologiques et moléculaires des lésions de démyélinisation des périplaques (LDP). Connaissant l'impact décisif des lésions de la moelle épinière sur le développement des atteintes neurologiques chroniques et irréversibles (Tallantyre *et al.* 2010; Bramow *et al.* 2010; Schirmer *et al.* 2011; Patrucco *et al.* 2012), nous avons choisi de caractériser les LDP au sein de la moelle épinière de patients atteints de

formes progressives de la SEP. Nous nous sommes concentrés essentiellement sur les mécanismes immunitaires innés impliqués dans la formation des LDP que nous présentons dans le premier article de cette thèse. Nous avons donc analysé les profils neuropathologiques et transcriptomiques des LDP observées sur 21 échantillons *post-mortem* de moelle épinière de patients SEP atteints de formes primitivement ou secondairement progressives.

B/ Résultats principaux du travail

Cette étude histologique et moléculaire a permis de caractériser les LDP de la moelle épinière des patients SEP atteints de formes progressives, à l'échelle tissulaire, cellulaire et moléculaire. Nous pourrions résumer les faits marquants de notre étude de la façon suivante :

- 1) Les LDP sont constituées de larges zones partiellement démyélinisées. Elles ne sont pas limitées aux simples contours des plaques de démyélinisation mais s'étendent parfois à distance. Nous avons été surpris par leur étendue dramatique. Elles sont très fréquentes autour des plaques de la moelle épinière chez les patients atteints de formes progressives. Quel que soit le mécanisme de formation des LDP, elles ont potentiellement un fort impact sur le développement de l'atteinte neurologique des patients SEP.
- 2) Sur le plan moléculaire, le profil transcriptomique des LDP microdisséquées est clairement différent de celui observé dans la SBAN adjacente, suggérant des mécanismes cellulaires mis en jeu particuliers.
- 3) La perte axonale observée au sein des LDP est significativement plus importante que dans la SBAN. Toutefois, elle est moins prononcée que la perte myélinique. De façon surprenante, les axones qui sont encore myélinisés présentent des gaines de myéline anormalement larges. De plus, aucun signe de remyélinisation n'est observé.
- 4) Nous avons identifié un dialogue cellulaire spécifique des LDP :
 - L'inflammation dans les LDP est principalement caractérisée par une accumulation de macrophages/cellules microgliales en contact étroit avec les gaines de myéline. L'activité phagocytaire est présente mais de faible intensité. L'environnement inflammatoire, constitué de signaux à la fois pro-inflammatoires et anti-inflammatoires, est spécifique des LDP.
 - De fines altérations astrocytaires sont observées au sein des LDP. Des molécules astrocytaires incluant l'aquaporine 4, la connexine 43 et le transporteur de glutamate EAAT1 sont significativement sur-exprimés dans les LDP, par rapport à la SBAN, au niveau transcriptomique et protéique.

De façon générale, les LDP de la moelle épinière des patients SEP de formes progressives, de part leur taille, leur forme et la nature du milieu inflammatoire, semblent différer des plaques de démyélinisation. Si elles y sont indéniablement liées dans l'espace, elles pourraient évoluer indépendamment dans le temps. En effet, elles sont caractérisées par une perte lente et progressive de la myéline en présence de fines altérations cellulaires. Un dialogue spécifique des LDP semble s'établir entre les macrophages/cellules microgliales et les astrocytes activés. Ces résultats indiquent qu'un processus chronique de remodelage tissulaire s'opère au sein des LDP, faisant cette entité un compartiment à part entière. Le maintien de processus inflammatoires à bas bruit dans les LDP contribuerait, du moins en partie, à perpétuer voir étendre la démyélinisation progressive des périplaques et empêcher la remyélinisation.

C/ Article 1 et résultats associés

Afin de faciliter la lecture des résultats et d'exposer les données obtenues durant ma thèse, j'ai choisi un format intermédiaire entre l'article conventionnel et celui d'un texte libre. L'article, qui synthétise l'essentiel de ces résultats, vient d'être accepté dans le journal *Glia* et est présenté en annexe.

A specific macrophage/microglia activation program in periplaque regions of progressive MS spinal cords: a novel aspect of demyelination

Alice Lieury, PhD^{1, 2}, Marie Chanal, MsC^{1, 2}, Géraldine Androdias, PhD^{1, 2, 3}, Richard Reynolds, PhD⁴, Sylvie Cavagna, MsC¹, Pascale Giraudon, PhD¹, Christian Confavreux, MD^{1, 2, 3} and Serge Nataf, MD, PhD^{1, 2, 5}

¹ INSERM U1028; CNRS UMR 5292; Lyon Neuroscience Research Center, Neuro-Oncology and Neuro-Inflammation team, Lyon, F-69000, France

² University Lyon 1, Lyon, F-69000, France

³ Service de Neurologie A and Eugène Devic Foundation, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, Hospices Civils de Lyon (Lyon University Hospital), Bron, France

⁴ Wolfson Neuroscience Laboratories, Hammersmith Hospital Campus, Imperial College Faculty of Medicine, London, UK

⁵ Banque de Cellules et de Tissus, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon (Lyon University Hospital), Lyon, France

Acknowledgement statement: This work was supported by a research grant from ARSEP (French MS Research Society) to SN and a travel grant from ARSEP to AL. We would like to thank the “Centre Commun de Quantimétrie” from the University of Lyon for its precious help in analyses by confocal microscope and the genomic facility ProfileXpert-LCMT from the University of Lyon for its precious help in microdissection and microarray experiments. All MS tissue samples used in this study were supplied by the UK Multiple Sclerosis Society Tissue Bank (www.ukmstissuebank.imperial.ac.uk), funded by the MS Society of Great Britain (registered charity 207495). In memorium of Pr Confavreux who provided constant support and intellectual input to this work.

1) Context of the work

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) and the leading cause of neurological disability affecting young adults in the Western world (Confavreux & Compston 2006). Focal inflammatory demyelinating lesions have been extensively characterized and are traditionally classified as active, chronic active or inactive plaques according to the presence and distribution of plaque-infiltrating macrophages/microglia (Charcot 1865; Ferguson *et al.* 1997; Trapp *et al.* 1998; Lassmann *et al.* 2007). Moreover, it is now well established that substantial diffuse alterations occur in the normal-appearing white matter (NAWM) of MS patients (Lovas *et al.* 2000; Kutzelnigg *et al.* 2005; Zeis *et al.* 2008a; Howell *et al.* 2010; Androdias *et al.* 2010). These are characterized by a diffuse axonal loss, currently considered a major cause of irreversible neurological disability (Confavreux *et al.* 2000, 2003; Bjartmar *et al.* 2000; Miller *et al.* 2003; Kutzelnigg *et al.* 2005) and a diffuse inflammatory process that develops in both the brain and spinal cord (Kutzelnigg *et al.* 2005; Frischer *et al.* 2009; Howell *et al.* 2010; Androdias *et al.* 2010). However, little attention has been given so far to the so-called periplaque, which is defined as a ribbon of tissue of variable width localized between plaque borders and the adjacent NAWM. An in-depth analysis of periplaque regions may evidence crucial informations about the cellular mechanisms supporting plaque extension or, on the contrary, tissue repair. The potential benefit that can be driven from the analysis of periplaques comes from the persistence of oligodendrocytes, a cell type that by definition is lacking in demyelinated plaques. Several studies demonstrated remyelination, in the close vicinity of plaque borders (Prineas & Connell 1979; Brück *et al.* 2003; Patrikios *et al.* 2006; Henderson *et al.* 2009), but areas of incomplete demyelination, which form the major component of periplaques, have been poorly studied (Nijeholt *et al.* 2001). Similarly, MRI studies using newly-developed sequences demonstrated periplaque white matter alterations (Ropele *et al.* 2000; Ge *et al.* 2003; Moore *et al.* 2008; Seewann *et al.* 2009; Filippi & Rocca 2010; Vrenken *et al.* 2010) that indeed correspond to areas of incomplete demyelination (Zhang *et al.* 2013a).

In this context, our study aimed to identify histological and molecular characteristics of periplaque demyelinated lesions (PDLs). Knowing the crucial impact of MS spinal cord lesions on the development of chronic and irreversible neurological disability (Tallantyre *et al.* 2010; Bramow *et al.* 2010; Schirmer *et al.* 2011; Patrucco *et al.* 2012), we sought to characterize PDLs in the spinal cord of MS patients with progressive forms of the disease. We focused our attention on the molecular immunopathology of PDLs in order to identify immune mechanisms involved in PDL formation. We present these results in the first article of this thesis. To achieve this goal, the neuropathological and transcriptomic profiles of PDLs were assessed in post-mortem cervical spinal

cord samples obtained from 21 patients with secondary progressive MS (SPMS) or primary progressive MS (PPMS).

2) Main results of the work

This histological and molecular study drew up the neuropathological features of PDLs in the spinal cord of progressive MS patients. We can sum up the main conclusions of this study in the following way:

- 1) PDLs form large areas of incomplete myelin loss that extend distant away from the border of plaques. PDLs are highly frequent in the spinal cord of progressive MS patients and, whatever the mechanisms supporting their formation, are likely to impact significantly on neurological disability.
- 2) From a molecular point of view, transcriptomic profiles of PDLs are clearly different from those observed in the adjacent NAWM, which suggests the involvement of specific mechanisms.
- 3) When compared to the NAWM, a significant axonal loss was observed in PDLs that was, however, less pronounced relative to myelin loss. Surprisingly, axons that remained myelinated in periplaques harboured an overall thicker myelin sheath than myelinated axons of the NAWM. Moreover, there was not obvious sign of remyelination.
- 4) Inflammation in PDLs was mainly characterized by an accumulation of macrophages/microglia that were closely apposed to myelin sheaths but exerted relatively poor phagocytic activity. The inflammatory environment in PDLs appears to be characterized by the superimposition of pro- and anti-inflammatory molecular signatures that might to be specific of PDLs.
- 5) Finally, subtle astrocyte alterations are observed in PDLs. Especially, when compared to the NAWM, astrocyte-related molecules such as aquaporin 4, connexin 43 and the glutamate transporter EAAT1, were significantly up-regulated in PDLs at the mRNA and protein levels. These molecules are involved in astrocyte functions crucial for CNS homeostasis.

Overall, we found that the neuropathological features of PDLs, in the spinal cord of progressive MS patients, were not directly correlated to that of demyelinated plaques with regard to size, shape and plaque-associated inflammation. If demyelinated plaques and PDLs are indisputably linked in space, they may evolve independently in time. Indeed, PDLs are characterized by a slowly progressive loss of myelin accompanied by subtle cellular alterations. A specific molecular cross-talk sets up between macrophages/microglia and activated astrocytes. These results suggest that a chronic process of tissue remodelling occurs in PDLs, rendering PDLs a unique cellular

compartment. The maintenance of a low-grade inflammation in PDL may contribute, at least in part, to remyelination failure and to the perpetuation of periplaque progressive demyelination.

3) Characterization and choice of MS samples

a. A collaboration with the UK MS tissue bank

The main challenge in human CNS studies is to obtain good quality samples whatever for histological or molecular analyses. That is the reason why our study was performed in close collaboration with the United-Kingdom MS tissue bank and Professor Richard Reynolds' team. I spent a course of three weeks in their laboratory in order to learn how to perform a neuropathological screening of MS spinal cords with the gold standard criteria and methods used by neuropathologists specialized in MS. This allowed appropriate samples to be selected for our study on the basis of clinical data, tissue quality, presence and extent of plaques, as well as plaque activity.



b. Clinical data and selection of MS patients

The first step in selecting MS samples consists in determining a frame of acceptable clinical criteria. The whole access to clinical data is mainly given for MS cases that were eventually selected. Therefore, Table 1 is not an exhaustive representation of the analysed MS cases before selection but is intended to illustrate the process of selection. Among the 31 cases presented here, 21 were studied in-depth with regard to PDL features: 16 for histological characterization and 10 for molecular analysis.

We selected patients with progressive forms of the disease (PPMS and SPMS) to study the activation state of macrophages/microglia in a context of chronic inflammation. As statistically expected, PPMS patients are rare and the great majority of cases are SPMS. In the same way, we restricted our analysis to patients with a disease duration superior to 15 years. However, the two cases MS383 and MS408 have inferior disease duration and, for the next quoted criteria, were anyway not retained in our study. To minimize the effect of aging on our samples, we limited the age at death to 65 years old. Thus, we eliminated MS73 died at 80 years old. We also composed our cohort according to the sex ratio: 1 male for 2 females as represented in the population. Finally and as explained in the introduction part of the thesis, we focused our attention on patients with available spinal cord samples because of the lack of in-depth studies describing the spinal cord pathology despite the major impact of these lesions on disabilities.

This step was followed by the selection of samples according to the following criteria: tissue quality and the presence of lesions. The final selection is obviously a compromise between the successive selection steps. A few number of control non-MS cases was obtained that did not fulfill all the selection parameters, notably the age at death (Table 2). Actually, control samples are rare and therefore difficult to select.

Table 1 : Clinical data of selected MS cases

Sexe	MS	Activity of disease at death	Age at death (years)	Cause of death	Post-mortem delay (hours)	Disease duration (years)	Years since diagnosis	Years since wheelchair bound	Years since progressive	
MS58	F	SP	NA	51	NA	NA	21	NA	NA	NA
MS61	F	PP	NA	56	NA	NA	15	NA	NA	NA
MS73	F	SP	stable	80	Bronchopneumonia	20	50	44	32	30
MS79	F	SP	progression	49	Bronchopneumonia, MS	7	23	22	12	NA
MS82	F	SP	progression	49	Aspiration pneumonia	9	NA	NA	NA	NA
MS83	M	PP	progression	54	Bronchopneumonia	13	16	13	10	16
MS98	M	PP	progression	57	MS	21	33	33	NA	33
MS157	F	SP	stable	39	MS	12	22	19	10	18
MS162	F	SP	stable	58	Peptic ulcer disease, MS	14	22	21	15	8
MS165	F	SP	progression	59	Respiratory failure, cardiac arrest	10	20	12	4	14
MS166	F	SP	progresion	52	Bronchopneumonia, MS	7	36	36	6	16
MS182	F	PP	stable	56	Aspiration pneumonia, sepsis	14	33	33	27	33
MS200	F	SP	NA	44	NA	NA	19	NA	NA	NA
MS207	F	SP	progression	46	Pneumonia, MS	10	25	25	15	19
MS230	F	SP	progression	42	MS	31	19	19	5	6
MS234	F	PP	progression	39	Pulmonary embolism, pneumonia	15	15	9	7	15
MS235	M	SP	NA	53	NA	NA	29	NA	NA	NA
MS242	F	SP	NA	57	NA	NA	19	NA	NA	NA
MS289	M	SP	NA	45	NA	NA	18	NA	NA	NA
MS301	F	SP	stable	62	Septicaemia, recurrent urinary tract infection, hypokalaemia, MS	16	19	19	6	13
MS341	F	SP	progression	52	Aspiration pneumonia, MS	8	24	9	1	15
MS347	M	SP	progression	49	Metastatic pancreatic carcinoma	13	28	12	NA	2
MS356	F	SP	progression	45	Multiple sclerosis	10	16	16	NA	NA
MS383	M	PP	progression	42	Aspiration pneumonia, MS	17	8	7	6	8
MS402	M	SP	stable	46	Bronchopneumonia, MS	12	20	20	7	9
MS403	F	SP	stable	54	MS	11	28	16	6	15
MS405	M	SP	progression	62	Septicaemia, MS, metastatic colon cancer	12	25	24	18	19
MS408	M	SP	progression	39	Pneumonia, sepsis	21	10	2	1	2
MS413	M	SP	stable	61	Pancreatic cancer, respiratory failure	10	26	20	NA	15
MS423	F	SP	progression	54	Pneumonia	10	30	28	18	21
MS438	F	NA	NA	53	MS	17	18	12	4	NA

The 31 MS patients (21 females, 10 males) had a mean age at death of 52 +/- 8 years and a mean disease duration of 23 +/- 8 years. MS: multiple sclerosis, F: female, M: male, SP: secondary progressive, PP: primary progressive.

Table 2 : Clinical data of selected control cases

	Sexe	Age at death (years)	Cause of death	Post-mortem delay (hours)
C14	M	64	Cardiac failure	18
C25	M	35	Carcinoma of the tongue,	22
C30	M	75	Stroke, aspiration pneumonia	17
C39	M	82	Myelodysplastic syndrome, rheumatoid arthritis	21
C45	M	77	Cardio pulmonary degeneration, prostate cancer, old age, alzheimers	22

c. Characterization of MS samples

Localization of demyelinated lesions: MOG-staining

In order to select MS spinal cord samples that contained demyelinating lesions, snap-frozen and fixed-frozen blocks were screened using MOG-immunostaining (myelin oligodendrocyte glycoprotein). Briefly, frozen spinal cord sections were fixed with 10% formalin for 10 min, permeabilized in cold methanol for 15 min at 20°C and washed in running water. Sections were then treated in 0.3% H₂O₂ for 10 min, rinsed in PBS 1X and blocked in 10% normal horse sera for 1 h at room temperature. They were incubated overnight at 4°C with the monoclonal primary antibody targeting MOG protein (Clone Z12; 1:50) diluted in blocking solution. Sections were rinsed 3 times in PBS 1X and incubated with a horse anti-mouse secondary biotinylated antibody (Molecular Probes; 1:200), for 1 h at room temperature. They were incubated with Avidin-Biotin horseradish peroxidase complex (ABC; DAKO) in PBS X for 1 h, revealed using DAB procedure, rinsed in tap water and haematoxylin stained. Finally, sections were rinsed in tap water before being dehydrated in ethanol and xylene baths, and mounted.

Areas negative for staining delineate demyelinated plaques (Fig. 1A). At this step, the morphology of myelin sheaths can be evaluated on MOG-staining and is highly representative of tissue quality (Fig. 1B). Thus, only samples containing demyelinated lesions and presenting the best tissue quality were selected.

Classification of demyelinated plaques: ORO-staining

In order to classify MS demyelinated lesions, ORO-staining (Oil-Red O) was performed on adjacent sections to MOG-stained sections. ORO stains for lipids in red: myelin sheaths appear in light red and myelin debris in macrophages/activated microglia appear in red (Fig. 1C). Briefly, snap frozen spinal cord sections were fixed with 10% formalin for 10 min and washed in running water. Sections were then treated with 60% triethyl phosphate for few seconds and incubated in ORO solution for 15 min. Sections are first rinsed in 60% triethyl phosphate and in running tap water, counterstained in haematoxylin for 10 min, rinsed in tap water and mounted. The

inflammatory activity of demyelinated lesions was evaluated on the basis of ORO⁺ macrophage/activated microglia localization (Fig. 1C). Active plaques, which are quite unfrequent in the samples we examined, contain ORO⁺ cells in the core and at the border of the plaque. Chronic active plaques contain ORO⁺ cells only at the border and chronic silent plaques do not contain ORO⁺ cells.

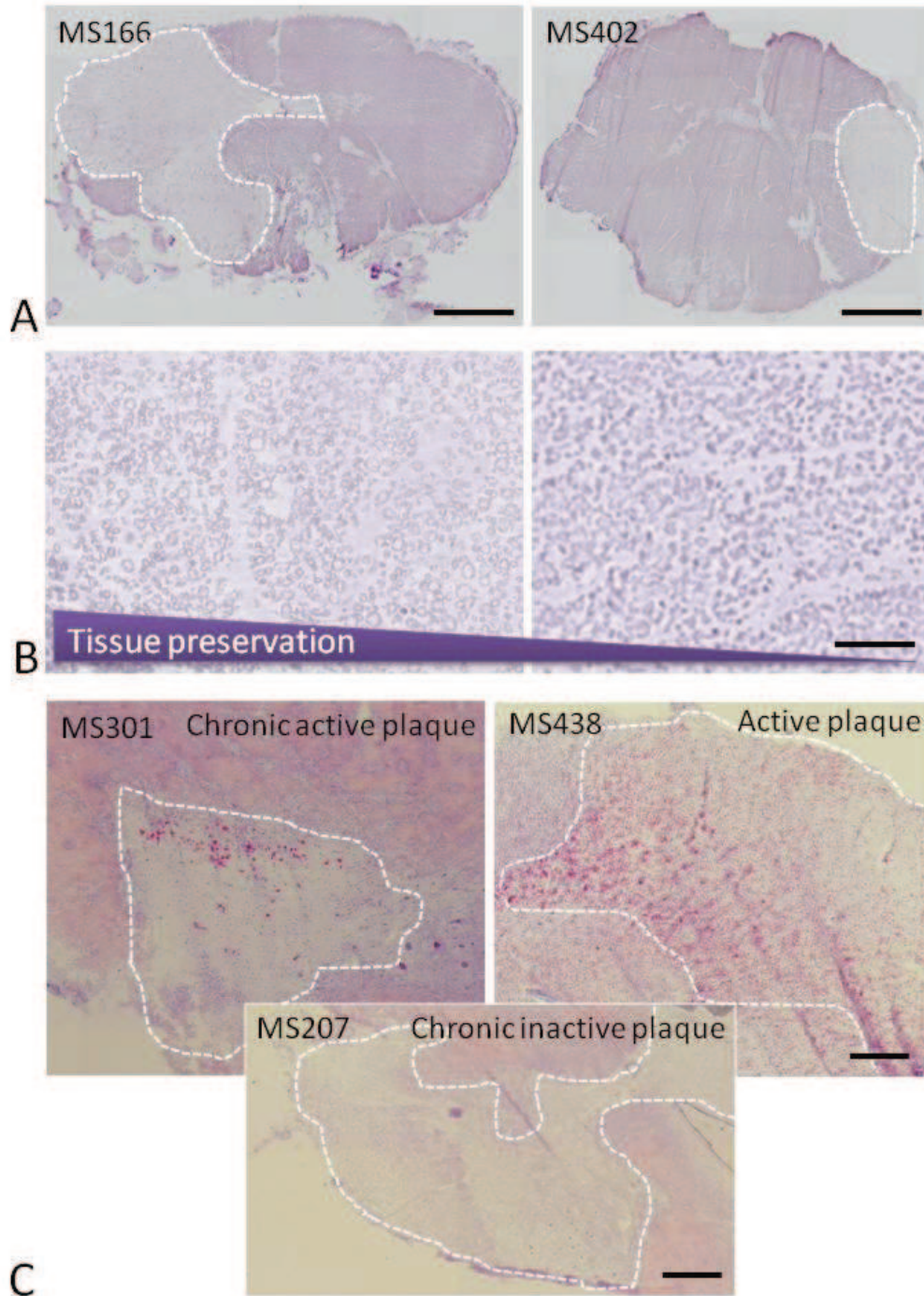


Figure 1: Localization and classification of demyelinated lesions in MS samples. **A.** Photomicrographs of two MOG-stained transversal spinal cord sections from progressive MS patients show the extent of demyelinated plaques (scale bars: 2 mm). **B.** Higher magnification views of MOG-stained sections present the difference between high (left panel) and poor (right panel) tissue quality (scale bars: 150 μ m). **C.** Photomicrographs of three ORO-stained demyelinated lesions show an example of each type of plaque activity according to the presence and amount of ORO-positive macrophages (scale bars: 1 mm).

d. Choice of MS samples for histological and molecular studies of PDLs

After the selection of a large MS cohort matching our criteria, best blocks of tissue were selected on the basis of sample properties, that is to say a substantial size of the sample, a good tissue quality and the presence of demyelinated lesions and partially demyelinated tissues likely to be PDLs (Table 3 and 4).

For the histological characterization of PDLs, we used a first cohort only constituted of cervical spinal cord blocks (C1-C3). We excluded samples where partially demyelinated tissues were not directly associated to demyelinated lesions because they were therefore suggestive of Wallerian degeneration areas. We then assessed the presence of PDLs in other segments of the spinal cord (thoracic and lumbar) and we used different segments for the molecular characterization.

A “good” tissue quality depends on the experiments that will be performed on the sample (Durrenberger *et al.* 2010). Decisive points for better immunostainings and RNA/protein analyses is the lack of reanimation medical procedures in the last 48h preceding death and the *post-mortem* delay (corresponding to the delay between the death of the patient and the tissue preparation) as short as possible (Table 1 and 2). The UK MS tissue bank pays special attention to reduce this period and therefore increase tissue quality. MS230 was not retained in the study because of a *post-mortem* delay judged too long. For immunohistochemistry, fixed-frozen or snap-frozen samples were chosen depending on the targeted antigen (Table 3). When an aspect of intact myelin sheaths is preserved in the NAWM, it is generally the case for other tissue structures. However, molecular analyses and especially microarray studies require more stringent selection criteria including a minimal *post-mortem* delay to preserve a good RNA quality (Durrenberger *et al.* 2010). RNA quality is assessed by the RIN value (RNA integrity number) that was measured on cerebellum samples of all analysed patients. Only snap-frozen samples with the highest RIN values were selected for RNA and protein extraction. Snap-frozen blocks adjacent to the fixed-frozen blocks analysed in the histological part were not always available. Table 4 presents part of the sample selection.

Finally, after this severe selection to optimize our analysis, 11 fixed-frozen samples were selected and added to the previous cohort of 16 fixed-frozen samples from the same tissue bank available in the laboratory (27 samples selected in Table 3). Also, 17 snap-frozen samples were selected for the molecular study (12 MS cases and 3 controls in Table 4). For laser microdissection experiments, specific attention was given to the presence and extent of PDLs in order to ensure that areas of large-enough surfaces could be microdissected.

Table 3: Screening of MS spinal cord fixed-frozen samples

Cases	Block	SC region	Number of lesions	PDL surface	NAWM surface	Myelin quality	ORO staining	Sample size	Selection
MS58	SCA3	cervical	1	++	+	++	chronic active	+	x
MS61	?	cervical	2	+	+	++	chronic silent	+	x
MS73	SCA5	thoracic	1	+	+	+	NA	small	x
MS73	SCA7	lumbar	NA	NA	NA	NA	NA	impaired	
MS76	SCA4	thoracic	0	0	+	+	0	+	
MS79	SCA2	cervical	2	++	+	++	chronic active	+	x
MS82	SCA2	cervical	3	++	+	+	chronic silent	+	x
MS83	SCA2	cervical	1	++	+	++	chronic silent	+	x
MS98	?	cervical	1	++	+	++	chronic active	+	x
MS100	SC3	cervical	CS	0	0	0	NA	+	
MS106	SCA5	thoracic	too large	+	0	0	NA	+	
MS106	SCA7	lumbar	too large	+	0	+	chronic silent	absent	x
MS107	SCC1	cervical	NA	NA	NA	NA	NA	absent	
MS157	SCA2	cervical	3	++	+	++	chronic silent	+	x
MS162	?	cervical	0	0	+	+	0	+	
MS166	SCA2	cervical	2	++	+	++	chronic active/silent	+	x
MS182	?	cervical	1	+	0	0	chronic active	+	x
MS197	SC2	cervical	CS	0	0	0	NA	+	
MS200	SCA1	cervical	1	+	+	+	chronic active	+	x
MS207	SCA2	cervical	1	++	+	++	chronic active	+	x
MS230	SCA3	cervical	NA	NA	NA	NA	NA	absent	
MS230	SCA5	cervical	too large	+	0	+	NA	very small	x
MS234	SCA3	cervical	2	++	+	++	chronic active	+	x
MS235	?	cervical	4	+	+	+	active/chronic silent	+	x
MS242	?	cervical	1	+	+	+	chronic silent	+	x
MS256	SC2	cervical	CS	0	0	0	NA	+	
MS256	SC3	cervical	CS	0	0	0	NA	+	
MS280	SCA3	cervical	0	0	+	+	0	+	
MS289	SCA3	cervical	too large	+	0	+	chronic active	+	x
MS356	SCA8	lumbar	0	0	+	+	0	small	
MS356	SCA9	lumbar	0	0	+	+	0	very small	
MS356	SCA10	lumbar	2	+	+	++	inactive	+	x
MS402	SCA1	lumbar	1	++	-	++	inactive	+	
MS402	SCA2	lumbar	1	++	+	++	inactive	+	x
MS402	SCA3	thoracic	0	0	+	++	inactive	+	
MS403	SCB1	cervical	1	++	+	+	inactive	+	x
MS403	SCB3	cervical	0	0	+	++	inactive	+	
MS403	SCB4	thoracic	0	0	+	++	0	+	
MS405	SCA1	cervical	1	++	+	++	inactive	very small	
MS405	SCA2	cervical	1	++	+	+	inactive	very small	x
MS405	SCA3	cervical	2	+	+	+	inactive	+	
MS408	SCA1	cervical	CS	++	0	++	chronic active	very small	
MS408	SCA2	cervical	1	++	+	+	chronic active	+	x
MS408	SCA4	thoracic	1	++	+	++	active	+	x
MS413	SCB1	cervical	1	+	+	++	inactive	+	x
MS413	SCB2	cervical	0	0	+	+	0	+	
MS413	SCB3	cervical	0	0	+	-	0	+	
MS423	SC1	cervical	2	+	+	++	inactive	+	
MS423	SC2	cervical	3	++	+	+	inactive	+	x
MS423	SC3	cervical	1	++	-	++	inactive	+	x
MS438	SC1	lumbar	CS	0	0	0	inactive	+	
MS438	SC2	lumbar	too large	+	-	++	inactive	very small	
MS438	SC3	lumbar	too large	+	0	++	inactive	+	
MS444	SC1	cervical	CS	0	0	0	inactive	+	
MS444	SC2	cervical	CS	0	0	0	inactive	+	
MS444	SC3	cervical	too large	+	0	+	inactive	+	

Lesions are demyelinated plaques: “CS: complete section” consists in the whole section demyelinated. SC: spinal cord.

Table 4: Screening of MS spinal cord snap-frozen samples

Cases	Block	SC region	Number of lesions	PDL surface	NAWM surface	Myelin quality	ORO staining	RIN	Sample size	Selection
MS58	SCA4	cervical	1	++	-	-	chronic active	6,5	absent	
MS79	SC1	cervical	1	++	0	++	chronic active	5,4	absent	
MS79	SC3	thoracic	1	++	+	++	chronic active	5,4	absent	
MS82	SC1	cervical	4	+	+	+	chronic silent	5,1	+	
MS82	SC2	cervical	1	+	+	-	chronic silent	5,1	+	
MS82	SC3	thoracic	1	++	+	+	chronic silent	5,1	+	x
MS82	SC5	thoracic	2	+	+	++	chronic silent	5,1	+	
MS82	SC7	lumbar	1	++	+	++	chronic active	5,1	+	x
MS83	SC1	cervical	1	++	+	++	chronic silent	4,1	absent	
MS83	SC3	cervical	0	0	+	+	chronic silent	4,1	+	
MS83	SC5	thoracic	0	0	+	-	chronic silent	4,1	+	
MS83	SC6	thoracic	1	0	+	+	chronic silent	4,1	+	
MS83	SC8	lumbar	2	+	+	-	chronic silent	4,1	+	
MS103	SC	cervical	4	++	+	++	NA	7,5	+	
MS157	SC2	cervical	1	++	-	-	chronic silent	5,2	+	
MS157	SC3	thoracic	1	++	-	++	chronic silent	5,2	+	x
MS157	SC4	thoracic	2	+	+	-	chronic silent	5,2	small	
MS166	SC1	cervical	3	++	+	++	chronic active	6,9	+	x
MS166	SC3	thoracic	2	++	+	++	chronic silent	6,9	+	
MS166	SC4	thoracic	1	++	+	++	chronic active	6,9	+	x
MS200	SCE6	thoracic	1	++	-	+	chronic silent	5,1	+	
MS200	SCG9	lumbar	2	++	-	+	chronic silent	5,1	+	
MS207	SC3	thoracic	1	++	-	+	chronic silent	6,8	small	
MS207	SC5	thoracic	1	++	+	+	chronic active	6,8	small	x
MS231	SC1	cervical	1	0	+	-	chronic silent	5,6	+	
MS231	SC2	cervical	0	0	+	+	chronic silent	5,6	+	
MS231	SC3	cervical	0	0	+	-	chronic silent	5,6	+	
MS231	SC4	thoracic	0	0	+	+	chronic silent	5,6	+	
MS231	SC5	thoracic	0	0	+	-	chronic silent	5,6	+	
MS231	SC6	thoracic	0	0	+	-	chronic silent	5,6	+	
MS234	SCA1	cervical	2	++	+	++	chronic active	5,1	absent	
MS234	SCA2	cervical	3	++	-	++	active	5,1	+	
MS234	SCA3	cervical	1	++	+	++	chronic active	5,1	absent	
MS234	SCA4	thoracic	2	++	+	+	chronic active	5,1	+	
MS234	SCA5	thoracic	1	++	+	++	active	5,1	absent	
MS234	SCA6	thoracic	1	+	+	-	chronic active	5,1	+	
MS234	SCA7	lumbar	too large	++	0	++	chronic active	5,1	+	
MS234	SCA8	lumbar	1	++	+	+	active	5,1	absent	
MS241	20.SC	thoracic	4	++	+	++	NA	6,1	absent	
MS266	18.SC	cervical	0	0	+	++	0	6,5	+	
MS266	SC.2.20	cervical	NA	NA	NA	NA	NA	6,5	+	
MS269	20.SC	cervical	1	++	+	++	chronic silent	NA	+	
MS280	SC2	cervical	0	0	+	+	active	6	+	
MS280	SC3	thoracic	0	0	+	+	chronic silent	6	+	
MS280	SC4	thoracic	0	0	+	-	chronic silent	6	+	
MS280	SC5	lumbar	1	+	+	+	chronic silent	6	+	
MS289	SC1	cervical	CS	0	0	-	chronic silent	6,6	+	
MS289	SC2	thoracic	CS	0	0	-	chronic silent	6,6	+	
MS289	SC3	thoracic	CS	0	0	-	chronic silent	6,6	+	
MS289	SC4	thoracic	CS	0	0	-	chronic silent	6,6	+	
MS289	SC5	lumbar	CS	0	0	-	chronic silent	6,6	+	
MS289	SC6a	lumbar	CS	0	0	-	chronic silent	6,6	+	
MS289	SC6+b	lumbar	2	+	+	-	chronic silent	6,6	+	
MS301	18.SC	cervical	4	++	+	+	chronic active	8,2	absent	
MS301	24.SC	thoracic	NA	NA	NA	NA	NA	8,2	+	
MS301	SC1	cervical	2	+	+	-	chronic active	8,2	+	x
MS301	SC2	cervical	1	0	+	-	chronic silent	8,2	+	
MS301	SC3	cervical	1	0	+	-	chronic silent	8,2	+	
MS306	18.SC	cervical	2	++	+	++	NA	6,4	+	
MS311	18.SC	cervical	1	++	-	++	chronic active	6,4	+	
MS318	18.SC	cervical	too large	++	0	++	NA	6,4	+	
MS341	SC5	thoracic	3	++	+	+	chronic silent	7,2	+	x
MS347	SC1	cervical	2	0	+	-	chronic silent	7	+	
MS347	SC2	cervical	3	+	+	-	chronic silent	7	+	x
MS347	SC3	cervical	1	+	+	-	chronic silent	7	+	
MS347	18.SC	cervical	3	++	+	++	NA	7	absent	

MS377	18.SC	cervical	4	++	-	++	NA	7,4	+	
MS381	18.SC	cervical	0	0	+	++	0	7,4	+	
MS383	SC1	cervical	3	++	+	-	chronic active	8	+	x
MS383	SC4	thoracic	1	++	+	-	chronic silent	8	+	
MS383	SC5	thoracic	1	0	+	+	active	8	+	
MS383	18.SC	cervical	4	++	+	++	active/chronic active	8	absent	
MS390	18.SC	cervical	NA	NA	NA	NA	active	NA	+	
MS402	SC1	cervical	2	+	-	-	chronic silent	NA	+	
MS402	SC2	cervical	3	++	+	++	chronic silent	NA	+	x
MS402	SC3	cervical	3	++	-	++	chronic silent	NA	+	
MS403	SC1	cervical	0	0	+	++	chronic silent	NA	+	
MS403	SC2	cervical	1	++	+	++	chronic silent	NA	+	
MS403	SC3	cervical	1	++	+	++	chronic silent	NA	+	x
MS413	SC1	cervical	1	++	+	++	chronic silent	NA	+	x
MS413	SC2	cervical	2	0	+	-	chronic silent	NA	+	
MS413	SC3	cervical	1	0	+	-	chronic silent	NA	+	
MS438	SC1	cervical	1	+	-	-	chronic active	NA	+	x
MS438	SC2	cervical	too large	+	0	++	chronic active	NA	+	
MS438	SC3	cervical	CS	0	0	?	chronic active	NA	+	
C14	SCE5	thoracic						7,4	+	x
C39	SC	cervical						6,3	+	x
C45	SC3	cervical						6,6	+	x

Lesions are demyelinated plaques: “CS: complete section” consists in the whole section demyelinated. The column ORO-staining was assessed by MHC Class II-staining for oldest samples. Demyelination was assessed by MOG-staining or Luxol Fast Blue staining for oldest samples. SC: spinal cord, RIN: RNA integrity number.

4) Material and methods

a. Cases and *post-mortem* material:

Histological analyses were performed on *post-mortem* fixed-frozen spinal cord samples from 16 MS cases that were all obtained from the UK MS Tissue Bank at Imperial College (London, UK) via a UK prospective donor scheme in accordance with the relevant ethics committee approval (MREC/02/2/39). Clinical data regarding these MS patients have been previously published (Androdias *et al.* 2010) and are summarized in table 5. The microarray analyses were performed on *post-mortem* snap-frozen spinal cord samples from 8 MS cases obtained from the same source. Clinical data for these cases are summarized in table 6.

As presented in the description of sample selection, the 16 fixed-frozen samples used for histological characterization were selected among the first cohort available in the laboratory according to the presence of demyelinated lesions and tissue quality. For molecular analyses, 14 snap-frozen MS samples, from 12 MS cases, matched our criteria. Figure 2 explains why definitive analyses of microarray data were finally performed on 8 MS cases.

Table 5: Demographic and clinical data in histological analyses (fixed-frozen samples)

Case	Sex	Age at death	Disease duration	Disease course
MS58	F	51	21	SP
MS61	F	56	15	PP
MS79	F	49	23	SP
MS82	F	49	NA	SP
MS83	M	54	16	PP
MS98	M	57	12	PP
MS157	F	39	22	SP
MS165	F	59	20	SP
MS166	F	52	36	SP
MS182	F	56	33	PP
MS200	F	44	19	SP
MS207	F	46	25	SP
MS234	F	39	15	PP
MS235	M	53	29	SP
MS242	F	57	19	SP
MS289	M	45	18	SP

Age is expressed in years. The 16 MS patients (12 females, 4 males) had a mean age at death of 50.5 +/- 6 years and a mean disease duration of 21.5 +/- 8 years. MS: multiple sclerosis; F: female; M: male; SP: secondary progressive; PP: primary progressive.

Table 6: Demographic and clinical data in microarray analyses (snap-frozen samples)

Case	Sex	Age at death	Disease duration	Disease course
MS157	F	39	22	SP
MS166	F	52	36	SP
MS207	F	46	25	SP
MS301	F	62	19	SP
MS341	F	52	24	SP
MS402	M	46	20	SP
MS403	F	54	28	SP
MS413	M	61	26	SP

Age is expressed in years. The 8 MS patients (6 females, 2 males) had a mean age at death of 51.5 +/- 8 years and a mean disease duration of 25 +/- 5 years. MS: multiple sclerosis; F: female; M: male; SP: secondary progressive.

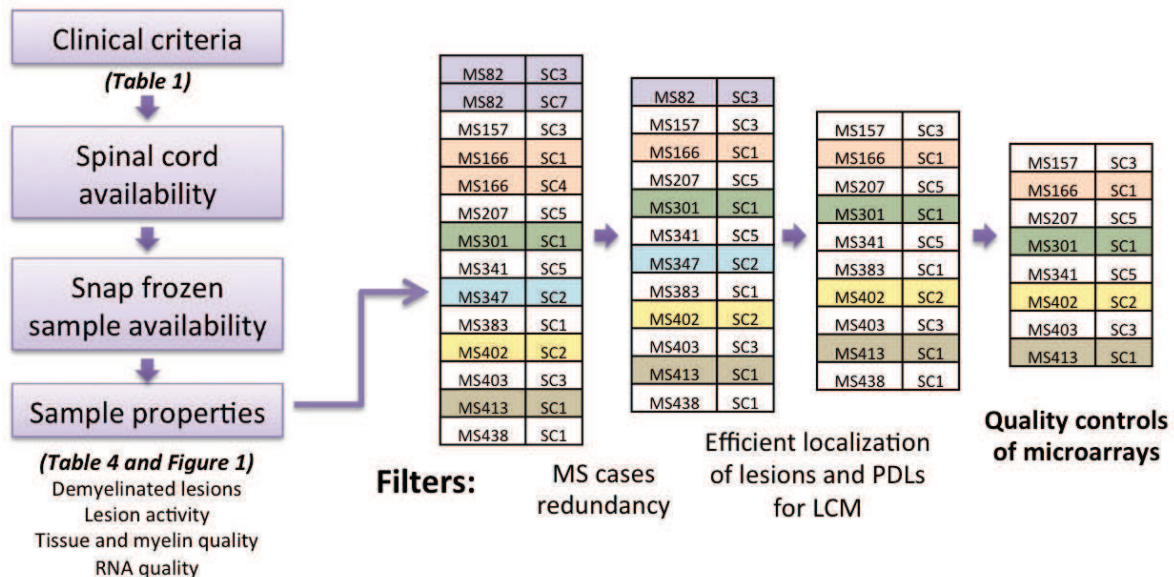


Figure 2: Final selection of microarray data. From the clinical criteria to the control procedure of microarray experiments, the transcriptomic profiles of 8 MS cases were analysed. LCM: laser capture microdissection.

b. Histological analyses

Immunohistology

Procedures followed for immunohistology were identical to those we previously reported for the analysis of MS spinal cords (Androdias *et al.* 2010). Only blocks obtained from upper levels (C1-C3) of cervical spinal cords were used for in-depth histological analyses. Briefly, fixed spinal cord sections were incubated overnight at 4°C with one or two of the following primary antibodies (Table 7) diluted in blocking solution. Sections were rinsed 3 times in PBS 1X and incubated with a goat anti-mouse or a goat anti-rabbit (Molecular Probes; 1:200) secondary antibody, biotinylated or associated with Alexa fluorochrome 555, 488 or 647 for 1 h 30 min at room temperature. Following another wash in PBS 1X, nuclei were visualized with 4',6-diamine-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Roche) staining for immunofluorescence. Slides were finally mounted using Fluoroprep (BioMérieux) and analyzed on a fluorescent microscope (Axioplan II, Zeiss, Munich, Germany) or on a confocal microscope (Leica TCS SP2). Biotinylated secondary antibody was revealed using DAB procedure (DAKO) following manufacturer's instructions. For all immunostainings, controls were performed by omitting the primary antibody.

Table 7: Antibodies used for immunohistochemistry

Primary antibody	Antibody type	Target	Clone	Dilution	Source
AQP4	Rabbit (pAB)	Aquaporin 4		1:50	Millipore, AB2218
CD163	Mouse (mAB)	M2 macrophage/microglial marker	Clone 10D6	1:50	Thermo scientific, USA; MS-1103-S1
CRMP5	Rabbit (pAB)	Oligodendrocyte collapsin response mediator protein 5 positive		1:500	Covalab (Ricard <i>et al.</i> 2000; Maignier <i>et al.</i> 2010)
CX43	Mouse (mAB)	Connexin 43	Clone2, 252-270	1:1000	BD Biosciences
CXCR4	Rabbit (pAB)	Chemokine receptor CXCR4		1:100	Abcam, AB2074
EAAT1	Rabbit (pAB)	Glutamate transporter GLAST	522-541	1:250	(Levy <i>et al.</i> 1995)
GFAP	Rabbit (pAB)	Astrocyte GFAP		1:2000	Dako, Z0334
IBA-1	Rabbit (pAB)	Macrophages/microglia		1:1000	Wako Chemicals, 019-19741
MBP	Mouse (mAB)	Myelin basic protein	Clone 1, 129-138	1:50	Serotec, MCA70
MHC class II	Mouse (mAB)	Antigen presenting cells	Clone CR3/43	1:50	Dako, M0775
MOG	Mouse (mAB)	Myelin oligodendrocyte glycoprotein	Clone Z12	1:50	UK MS Tissue Bank
NF	Rabbit (pAB)	200 kDa neurofilament protein		1:500	Serotec, AHP245
TGFβR3	Rabbit (pAB)	TGFβ receptor 3		1:50	Abcam, AB28366

CRMP: Collapsin response mediator *protein*; EAAT: Excitatory amino acid transporter; GFAP: Glial fibrillary acidic protein; MBP: Myelin basic protein; MHC: Major histocompatibility complex; MOG: Myelin oligodendrocyte glycoprotein; TGFβ: Transforming growth factor beta; pAB: polyclonal antibody mAB: monoclonal antibody.

Assessment of plaque activity

The inflammatory activity of demyelinating lesions was evaluated on the basis of Iba-1⁺ macrophage/activated microglia density and morphology in the core and at the border of plaques. Indeed, in addition to ORO classification, we classified plaque activity using immunodetection according to Iba-1⁺ cells as previously described using MHC class II staining (Ferguson *et al.* 1997; Trapp *et al.* 1998). However, we noticed that MHC class II staining was somehow under-evaluated when using immunofluorescence techniques as compared to immunoenzymatic DAB-based procedures. We thus opted for the Iba-1-staining by immunofluorescence, which gave a reliable mean to quantitatively evaluate the density of macrophages/microglia including amoeboid activated microglia (Fig. 3).

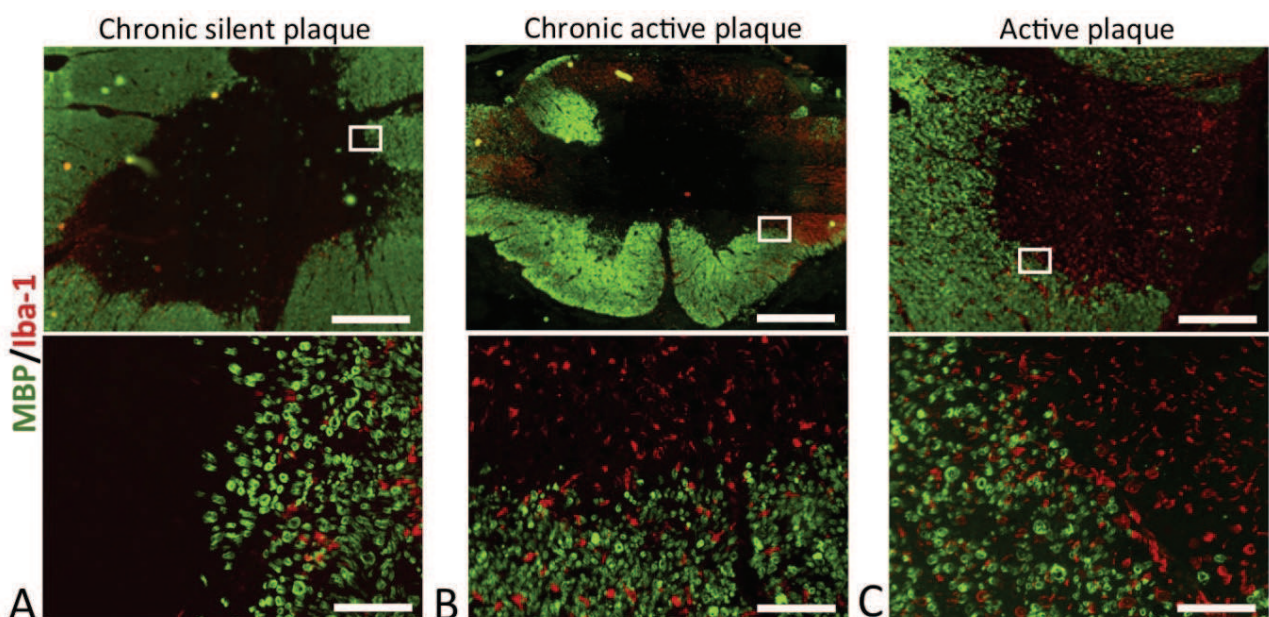


Figure 3: Assessment of plaque activity. Photomicrographs show Iba-1 (red)/MBP (green) double immunostainings in the PDLs and associated plaques of spinal cord sections from 3 progressive MS patients. Upper panels show low magnification views of periplaques associated with a chronic silent lesion (a), a chronic active lesion (b) or a fully active lesion (c). Scale bars: 500 μm (a), 1.5 mm (b), 200 μm (c). Lower panels show high magnification views of the periplaque/plaque boundary zone. Scale bars: 100 μm .

Measures of PDL area

Following myelin basic protein (MBP) immunofluorescence labelling, MS spinal cord sections were examined at x100-200 magnification using a fluorescent microscope (Axio Imager.Z1, Zeiss, Jena, Germany) coupled with a CCD camera (Axio Cam MRm, Zeiss). Areas of fully demyelinated tissue (plaques), partially demyelinated tissue (PDL) or apparently non-demyelinated tissue (normal-appearing white or grey matter, hereafter referred to as NAWM/NAGM) were then delineated and their surfaces measured using image analysis software (AxioVision Version 4.8 software, Zeiss). In addition, we performed a fully automated surface

analysis using a macro command developed with Image J software (Fiji Image J software, Max Planck Institut, Germany) (Fig. 4). Briefly, images of whole spinal cord sections were segmented in 5 000 μm^2 squares, in which the density of MBP staining was then calculated and attributed a score ranging from 100% (maximal MBP staining density) to 0% (plaque). A colour code was then applied allowing a graduation of myelin loss to be visualized and a delineation of plaques, PDL and NAWM/NAGM to be achieved. Using such a fully automated method, we found that for 4 randomly chosen spinal cord sections, the relative sizes of plaques (>80% myelin loss), PDL (25-80% myelin loss) and NAWM/NAGM (<20% myelin loss) were similar to those obtained by hand.

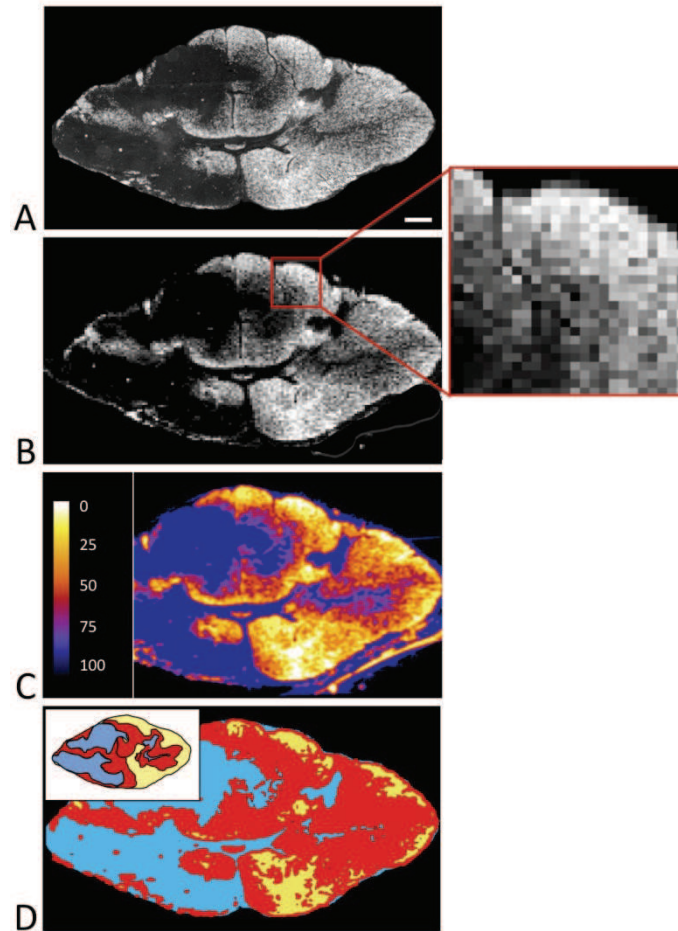


Figure 4: Automatic identification of periplaques in MS spinal cord. Mosaic reconstituted photomicrograph of a MBP-stained spinal cord section from a progressive MS patient is shown in **A** (MS 166) (scale bars: 1 mm). This photomicrograph is analysed in the next panels. **B**. The picture is segmented in squares about 5 000 μm^2 . A grey level is attributed to each square corresponding to the mean MBP staining density of the area. White corresponds to the maximal myelin density within the whole spinal cord section (100%) and black to the absence of myelin (0%). **C**. The drawing represents the gradient in myelin loss within the periplaque when moving away from the plaque to the NAWM/NAGM. The scale indicates the percentage of myelin loss as compared to the NAWM where the myelin density is maximal. **D**. The drawing represents the surfaces covered by plaques (blue), PDL (red) and NAWM/NAGM (yellow). These areas have been automatically determined on the previous analyzed pictures according to the myelin density: 0-20% myelin (blue), 25-80% (red), 80-100% (yellow). A drawing representing the visually determined surfaces covered by plaques (blue) and PDL (red) is shown in insert.

Quantitative analysis of macrophages/microglia, myelin and axonal densities

Following MBP/neurofilament (NF) or MBP/Iba-1 double immunostaining, images from selected areas were digitally photographed at x200 magnification using a fluorescent microscope (Axioplan II, Zeiss, Munich, Germany) coupled with a CDD camera (F-View II ; Soft Imaging System) and analyzed by an image analysis software (analysis 3.0; Soft Imaging System). A region of interest (ROI) was first defined and measured (mean surface area = 80 000 μm^2) in each area analyzed. Iba-1⁺, MBP⁺ and NF⁺ areas were then automatically detected after setting a threshold of positive staining in the NAWM. Then, the total area covered by MBP immunostaining, Iba-1 immunostaining or the number of NF⁺ particles was indexed to the total area covered by the ROI. For each area analyzed (PDL, plaque or NAWM), each data represents a mean percentage of values obtained in 3 independent ROI. Finally, in 4 randomly chosen MS samples, absolute numbers of Iba-1⁺ macrophages/microglia were counted, allowing to confirm that numerical densities of macrophages/microglia correlated highly significantly with the percentage area of the ROI covered by Iba-1 staining ($\rho = 0.84$, $p\text{-value} = 1.5 \cdot 10^{-13}$; Spearman rank correlation test, *data not shown*). For information, the used pan-neurofilament antibody recognizes both phosphorylated and non-phosphorylated epitopes of the 200 kDa neurofilament protein isoform and this antibody was previously used to evaluate axonal loss as it allows all axons to be visualized irrespective of their integrity (Lovas *et al.* 2000; Androdias *et al.* 2010). Moreover, it must be emphasized that measures of axonal density might be biased by the extent of spinal cord atrophy or oedema (Losseff & Miller 1998; Lovas *et al.* 2000; Androdias *et al.* 2010). However, as measures were compared between specific areas of the same sections, such a volumetric bias appears unlikely.

c. Molecular analyses

Laser Capture Microdissection

From each fresh frozen tissue sample, 10- μm thick frozen sections were prepared. The sections were mounted on slides (Super Frost Plus; Menzel GmbH, Braunschweig, Germany). The frozen sections were thawed for 30 s and were dehydrated in graded ethanol solutions (75%, 95%, 100%) of 30 s each. Then, the sections were cleared in 3 successive baths of xylene (respectively 2 min 30 s). The slides were kept in a vacuum desiccator for a minimum of 10 min. PDL and NAWM were isolated from the slides using the PixCell II laser capture microdissection system (LCM; Arcturus Engineering) (Fig. 5A). To microdissect a section, an adjacent section was MOG immunostained to localize plaque, PDL and NAWM regions. Correct localization was then further

ascertained under light microscope examination on the basis of differences in transparency and granularity between plaques, PDL and NAWM (Fig. 5B-C). Only PDLs covering white matter regions were microdissected. Laser capture was performed by lifting separately PDL and NAWM into HS-CapSure noncontact laser capture microdissection film. After visual control of the completeness of laser microdissection (caps control), the captured tissue was lysed with lysis buffer (Buffer RLT from Qiagen Rneasy Micro Kit).

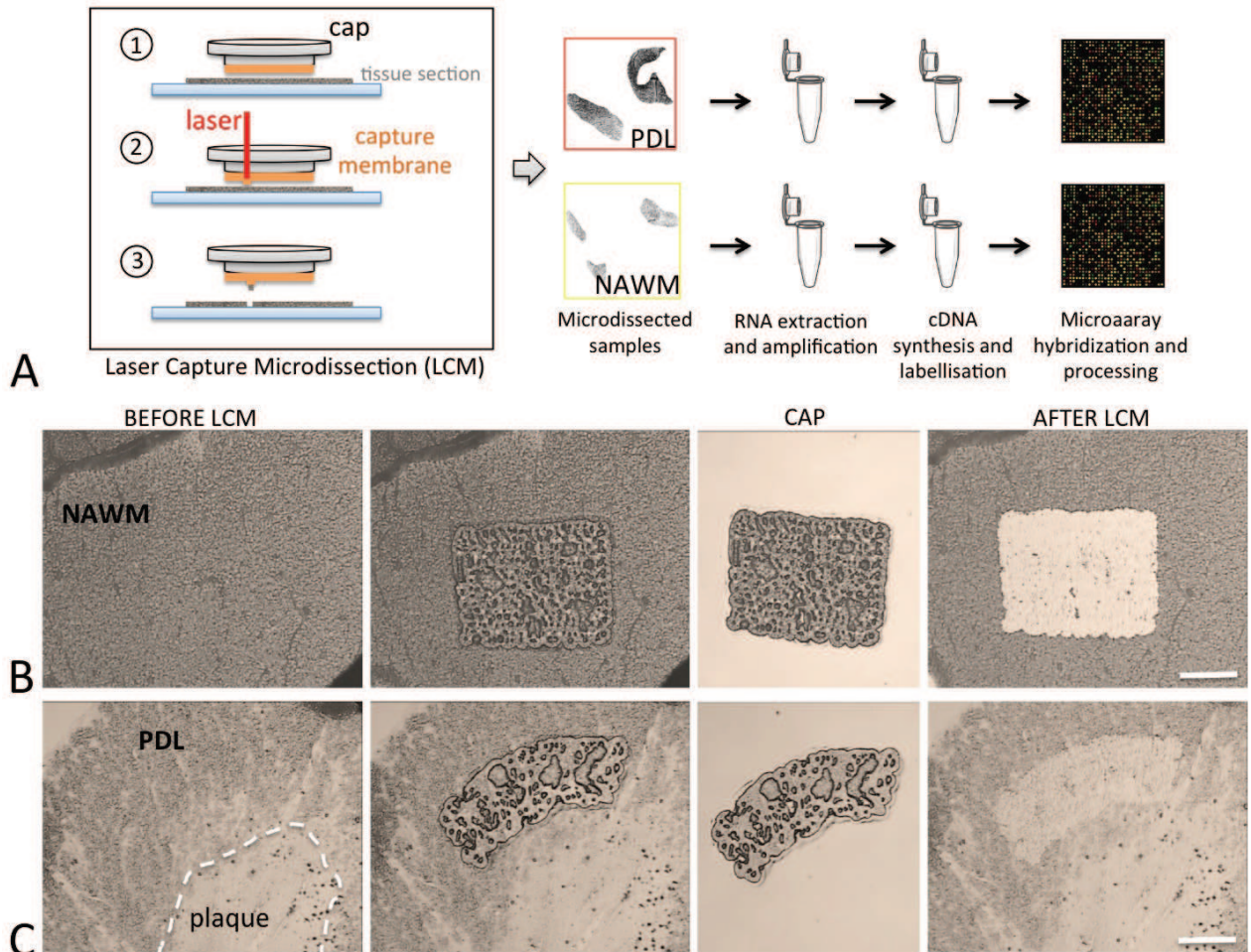


Figure 5: Laser capture microdissection (LCM) of PDL and NAWM samples. A. LCM procedure from microdissection to microarray processing. B, C. For each microdissected section, an adjacent section was MOG immunostained to localize plaque, PDL and NAWM regions. Correct localization was then further ascertained under light microscope examination on the basis of differences in transparency and granularity between plaques, PDL and NAWM. Photomicrographs illustrate the microdissection process in case MS301 for NAWM area in B and PDL area in C (left panels: before sampling; middle panels: microdissection and tissue harvest into the cap; right panels: after sampling). Scale bars: 100 μ m.

RNA extraction, amplification and labelling

Total RNA was isolated on silica-based columns, DNase-I digested and eluted with water using the Rneasy Micro kit (Qiagen, France) following the manufacturer's instructions. RNA

qualities were assessed on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France). The mean RNA Integrity Number was 6.3 (Table 8). Total RNA (800 pg) was amplified by three rounds of *in vitro* transcription (IVT) using ExpressArt® C&E mRNA Amplification Pico kit (AmpTec GmbH, Hamburg, Germany). During the last IVT amplification RNA was biotin-labeled using BioArray HighYield RNA Transcript Labeling kit (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, New York, USA). Before amplification, spikes of synthetic mRNA (GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Controls, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) at different concentrations were added to all samples; these positive controls were used to ascertain the quality of the process. Biotinylated antisense cRNA quantification was performed with a Nanodrop 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA) and quality checked with Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Inc, Palo Alto, CA, USA) (Table 8).

Microarray hybridization and processing

Experimental procedures were performed by the Lyon University genomic facility ProfileXpert-LCMT (Lyon) following an Affymetrix protocol routinely used by the laboratory. Hybridization was performed following Affymetrix protocol. Briefly, 10 µg of labeled cRNA was fragmented and denatured in hybridization buffer, then was hybridized on GeneChip® Human Genome U133 plus 2.0 array (Affymetrix) during 16 hours at 45°C with constant mixing by rotation at 60 rpm in the Hybridization Oven 640 (Affymetrix). After hybridization, arrays were washed and stained with streptavidin-phycoerythrin (GeneChip® Hybridization Wash and Stain Kit) in the Fluidics Station 450 (Affymetrix) according to the manufacturer's instruction. The arrays were read with a confocal laser (GeneChip® Scanner 3000 7G, Affymetrix). The CEL files were generated using the Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC) software 3.0. The obtained data were normalized with Affymetrix Expression Console software using MAS5 statistical algorithm. The threshold of detection was calculated using the normalized signal intensity of the 100 negative control samples in the array, represented by the “background” parameter (Table 8). This parameter includes the “noise” parameter, intrinsic to the microarray platform. The scale factor is the parameter applied to each microarray to normalize data (Table 8). For better comparisons between samples, these parameters (background, noise and scale factor) have to be as similar as possible between two compared samples, meaning here, between PDL and NAWM samples. Finally, spots with signal intensities below this detection threshold were referred to as “absent”. The quality of processing was evaluated by generating scatter plots of positive signal distribution comparing PDL and NAWM sample of one MS case. The used microarrays comprise 54 675 gene spots and a satisfying rate of 30% of genes was considered as “present”. GAPDH and β-actin probes were used as housekeeping genes. They have to be expressed at the same level between PDL

and NAWM samples of one case as observed on scatter plots excepted for MS383 and MS438. Moreover, 3' and 5' probes for GAPDH and β -actin were used to control cRNA integrity. After triple amplification, decreasing the mean size of cRNA products, tolerated 3'/5' ratio is about 12 or lower and has to be similar between PDL and NAWM samples. These control steps are resumed in table 8. At the end, 16 samples with the highest RNA and microarray quality were used (8 on 10 MS spinal cords) (Fig. 2). Actually, MS383 and MS438 were excluded from analyses for the previous criteria and a non normal distribution of microarray profiles. The raw data on gene expression in different samples of MS spinal cord are deposited in the Gene Expression Omnibus data repository:

<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?token=svinwqomfxudrct&acc=GSE52139>

Table 8: Quality controls from LCM procedure to microarray data

Samples	Laser pulses	RNA before amplification			Biotinylated cRNA after amplification			Microarray controls					
		pg/mL	ng	RIN	mg	Quality ratio 260/280	Mean size (bp)	"Present" genes	Noise	Background	Scale factor	3'/5' ratio GAPDH	3'/5' ratio β -actin
MS157-P	13852	235	3.76	6.6	13.50	2.3	440	29.1%	0.8	27.1	29.2	10.1	5.3
MS157-N	11099	368	5.89	6.8	30.89	2.5	392	26.3%	0.8	28.2	39.2	9.9	5.9
MS166-P	16455	372	5.95	7.8	18.32	2.4	467	36.0%	0.8	28.6	18.0	12.7	6.0
MS166-N	7073	360	5.76	4.8	21.01	2.5	280	30.7%	0.8	28.8	31.8	11.1	5.1
MS207-P	11200	402	6.43	8.3	11.24	2.2	448	32.9%	1.0	32.7	16.7	5.4	2.8
MS207-N	8520	324	5.18	7.7	10.80	2.2	260	27.0%	1.0	31.4	28.0	8.4	3.2
MS301-P	15120	207	3.31	5.4	24.54	2.4	332	26.9%	0.8	28.4	37.9	12.1	4.9
MS301-N	10920	269	4.30	6.4	27.90	2.5	408	25.7%	0.8	28.5	42.1	10.9	4.1
MS341-P	14210	180	2.88	5.6	9.44	2.2	250	28.1%	0.9	29.6	30.9	13.2	4.1
MS341-N	14490	235	3.76	3.0	10.68	2.3	263	23.0%	0.9	30.0	42.9	4.7	3.2
MS383-P	15682	280	4.48	8.3	21.36	2.4	371	30.4%	0.8	28.8	31.6	11.0	5.7
MS383-N	14554	204	3.26	3.0	19.19	2.3	230	21.0%	0.9	31.5	57.7	18.6	2.9
MS402-P	11636	459	7.34	5.7	20.68	2.4	530	31.9%	0.9	29.9	28.8	8.6	3.2
MS402-N	12230	375	6.00	7.7	20.87	2.3	440	33.8%	0.8	29.3	24.2	10.1	4.9
MS403-P	6927	156	2.50	2.5	45.99	2.5	278	27.0%	0.8	28.8	39.8	10.0	3.8
MS403-N	9579	160	2.56	4.0	10.90	2.4	300	25.8%	1.0	33.7	34.5	11.6	4.7
MS413-P	10883	175	2.80	8.3	10.39	2.3	460	35.1%	1.0	31.8	13.4	7.7	3.5
MS413-N	9348	157	2.51	NA	27.17	2.3	281	24.0%	0.9	30.4	37.7	12.0	4.0
MS438-P	13000	309	4.94	8.8	33.22	2.4	388	36.3%	0.8	29.0	19.8	8.7	3.7
MS438-N	10800	307	4.91	8.6	27.77	2.6	259	18.5%	0.8	26.7	92.2	5.3	9.0

The number of laser pulses to laser capture microdissect samples tends to be similar for PDL (P) and NAWM (N) samples. The RIN (RNA integrity number) value (optimal to 8) was determined after microdissection treatment in addition to the Bioanalyser RNA profile. The optimal quality ratio 260/280 is about 2. cRNA products count between 200 and 500 base pairs (bp) which is not too small. Last columns indicate microarray control steps and data to determine detection threshold. Red values are on the limit to be accepted for further analyses.

Microarray data analysis

For data analysis, a Principal Component Analysis (PCA) was first performed in order to explore and visualize our dataset of 16 microarrays (Fujita *et al.* 2008; Ringnér 2008). Differentially expressed genes were then identified on the basis of two complementary approaches. On the one hand, we used the two-class paired Significance Analysis of Microarrays (SAM) method (Tusher *et al.* 2001; Bazakos *et al.* 2012), implemented in TIGR MEV 4.5.1 software. This stringent analysis was used to determine the most common features of PDL to the 8 analysed patients and identify the most significant differentially expressed transcripts. The paired inputs for SAM analysis were the normalized intensity values of the PDL (P) and NAWM (N) conditions from the same patient (P_MSX vs. N_MSX). The significance cutoff, the delta value, was adjusted to $d = 1.25$ so as to set the median false discovery rate (FDR) to 10%. Differentially expressed genes were considered significant if the q-value was < 0.10 . A q-value estimates the probability of a true change at follow-up when the false discovery rate is 10%. For all analyses, we performed 256 unique permutations of the data to select the differentially expressed transcripts (Fig. 10). We chose this stringent method because it selects up and down-regulated genes that are common to all analysed patients. On the other hand, the non-parametric paired Wilcoxon test was used to identify a larger number of differentially expressed genes in PDL. P-values < 0.05 were considered statistically significant. Significant genes with expression ratio (PDL/NAWM) superior to 1.5 were up-regulated and inferior to 0.75, down-regulated in PDL. Genes identified as differentially expressed were then classified using GO ontology, the gene clustering TargetMine free software and a survey of the literature.

Western blot analysis

Plaques, PDLs and NAWM samples obtained from macrodissection of 800 μm tissue section were lysed (20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 10% sucrose, 1 mM EDTA, and 5 mM EGTA and Complete®), subjected to ultrasound fragmentation, and protein concentration was determined using Lowry assay (Bio-Rad). Proteins (20 μg) were separated under reducing conditions by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Schleider and Schuell). Proteins were immunodetected with specific antibody and then revealed by the ECL method (Pierce). Actin detection served as a control.

d. Statistical analysis

For the histological analyses, each data corresponds to a mean obtained from three measures. A mean \pm standard error of the mean (SEM) was assigned to each group of data. Comparisons between two groups of values were carried out by the non-parametric Wilcoxon test. Effect of one factor on three groups of values is measured by the non-parametric ANOVA test called Kruskal-Wallis test. Spearman rank correlation coefficients were calculated to identify interdependence of two variables. P-values < 0.05 were considered statistically significant. Levels of significance were indicated as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

5) Histological and molecular characterisation of periplaque demyelinating lesions (PDLs)

a. PDLs are extensive around spinal cord lesions

The first analysis consisted in the quantitative assessment of the extent of PDLs in MS spinal cords. MBP staining of cervical spinal cord sections showed that PDLs formed large areas of incompletely demyelinated white or grey matter that were adjacent to the borders of fully demyelinated plaques (Fig. 6A and 7). Interestingly, a computerized analysis of 4 randomly chosen MBP-stained spinal cord sections showed that, in a great majority of PDL regions examined, myelin loss progressively decreased from the plaque/PDL interface toward the NAWM (Fig. 6B). A PDL was apposed to all demyelinated plaques analyzed ($n = 25$, except for sections from MS289 case, that were demyelinated on the whole spinal cord surface). PDLs covered as much as 42% of the whole transverse spinal cord surface (mean: $16.9 \pm 13.1\%$; Fig. 6C) and in 8 out of 16 MS spinal cords, the cumulative surface covered by plaques and PDLs represented more than 60% of the total spinal cord surface (Fig. 6C). Interestingly, we did not find any significant correlation between the size of PDLs and the size of associated plaques ($r = -0.35$; $p = 0.11$, Spearman rank correlation test; Fig. 6D). However, PDLs surrounding chronic active plaques tended to cover larger surfaces ($14.9 \pm 3.6\%$ of the whole transverse spinal cord surface) than PDLs associated with chronic silent plaques ($7.8 \pm 2.0\%$) or active plaques ($5.1 \pm 0.7\%$) (Fig. 6E).

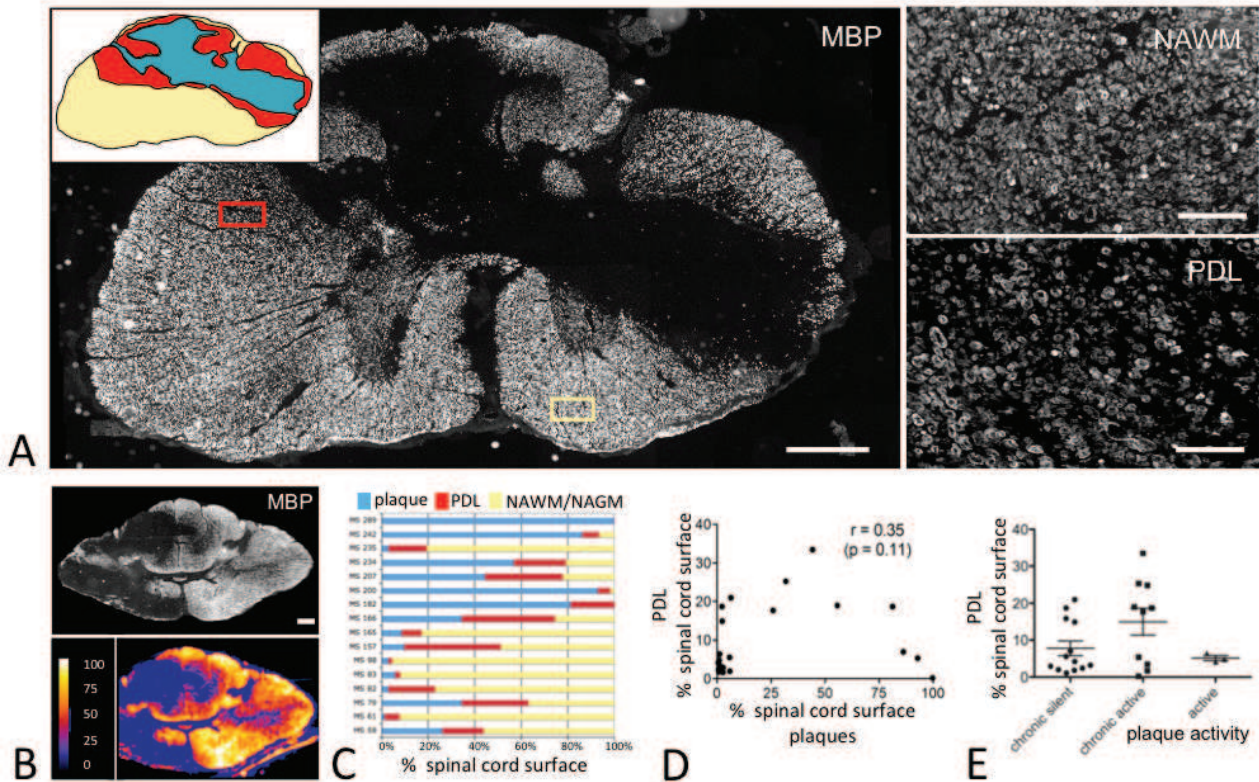


Figure 6: Identification of periplaque demyelinated lesions (PDLs) in MS spinal cords. **A.** A mosaic reconstituted photomicrograph of MBP-stained transversal spinal cord section from the progressive MS patient MS58 shows the extent of partially demyelinated tissue associated to a fully demyelinated plaque (scale bar: 1 mm). A drawing representing the surfaces covered by plaque (blue) and PDLs (red) is shown in insert. Higher magnification views of the NAWM (yellow square) and PDLs (red square) are shown in right panels (scale bars: 100 μ m). **B.** A mosaic-reconstituted photomicrograph of a MBP-stained spinal cord section (MS166) (upper panel, scale bar: 1 mm) was obtained and a fully automated image analysis of MBP density was then performed as described in Materials and Methods (lower panel). A color scale in the lower panel indicates colors corresponding to distinct myelin densities ranging from normal myelin density (NAWM, white) to the absence of myelin staining (plaque, blue). The image shows that in a great majority of PDL regions, myelin loss gradually decreases from the plaque/PDL interface toward the NAWM. Data shown is representative of 4 fully automated analyses performed on spinal cord sections derived from 4 distinct MS patients. **C.** Histogram showing the percentage of surface covered by plaques (blue), PDL (red) and NAWM/NAGM (yellow) in spinal cord sections from progressive MS patients. **D.** Dot diagram showing that sizes of PDL (percentage of spinal cord surface covered by PDL) do not correlate with the sizes of associated plaques (percentage of spinal cord surfaces covered by plaques) ($\rho = 0.35$, p -value = 0.11). **E.** Dot histogram showing that surfaces covered by PDL do not differ significantly depending on the type of plaque they associate to (p -value = 0.36). Note however that larger PDL surfaces associate to chronic active plaques.

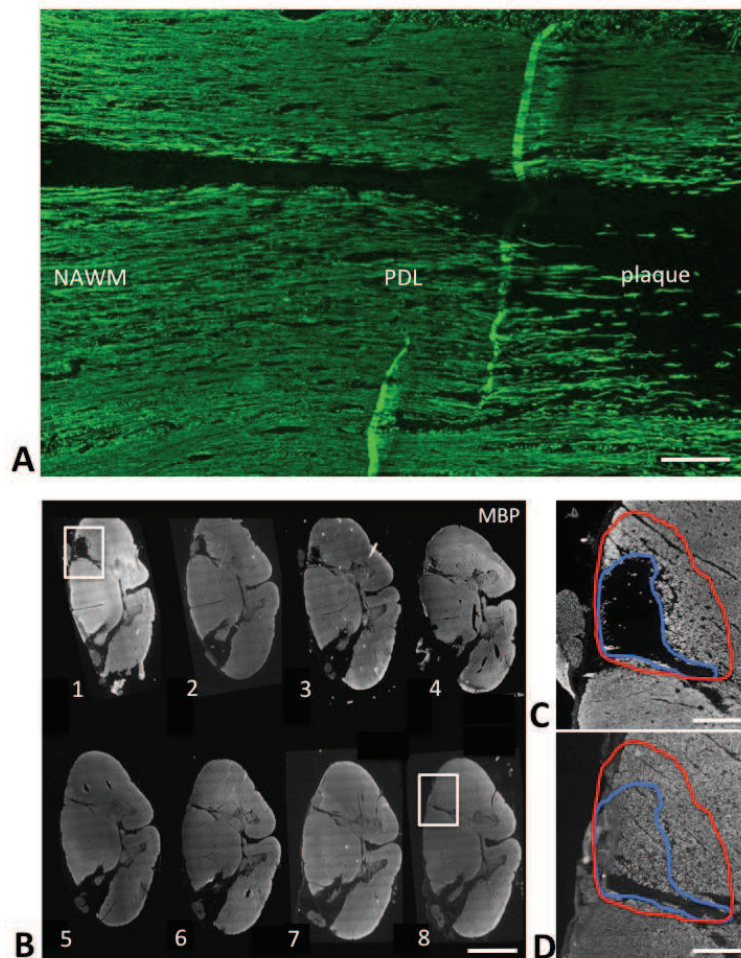


Figure 7: Longitudinal and serial transverse sections of PDLs. **A.** A mosaic reconstituted photomicrograph of an MBP-stained longitudinal section (MS235) shows that PDL covers a limited surface and does not appear to extend predominantly in the longitudinal axis of the spinal cord (scale bar: 500 µm). **B.** Eight serial transverse 12 µm-thick sections were performed every each 168 µm and were MBP-stained (MS165). Low magnification views of mosaic-reconstituted photomicrographs show a plaque that extends longitudinally from section 1 to section 4 (scale bar: 2 mm). **C, D.** High magnification views of plain squares delineated in section 1 (C) and section 8 (D) (distant each other from 1200 µm) show that in section 8 (D) myelin staining appears normal in the areas covered by plaque (blue) and PDL (red) in section 1 (scale bar: 500 µm).

b. Attempts of 3D reconstruction of PDLs

When analyzing longitudinal sections or serial transverse sections of MS spinal cords, we found that PDLs did not extend preferentially along the longitudinal axis, as it would have been expected in the case of Wallerian degeneration (Fig. 7). Actually, due to the tract anatomy of the spinal cord, we considered that secondary Wallerian degeneration should be much more extensively seen in longitudinal *vs.* transverse sections. We thus performed longitudinal sections of a cervical block from which transverse sections had shown the presence of PDL (MS235). To further demonstrate that PDLs do not systemically extend longitudinally along spinal cord tracts, serial transverse sections were performed on a cervical block (MS165).

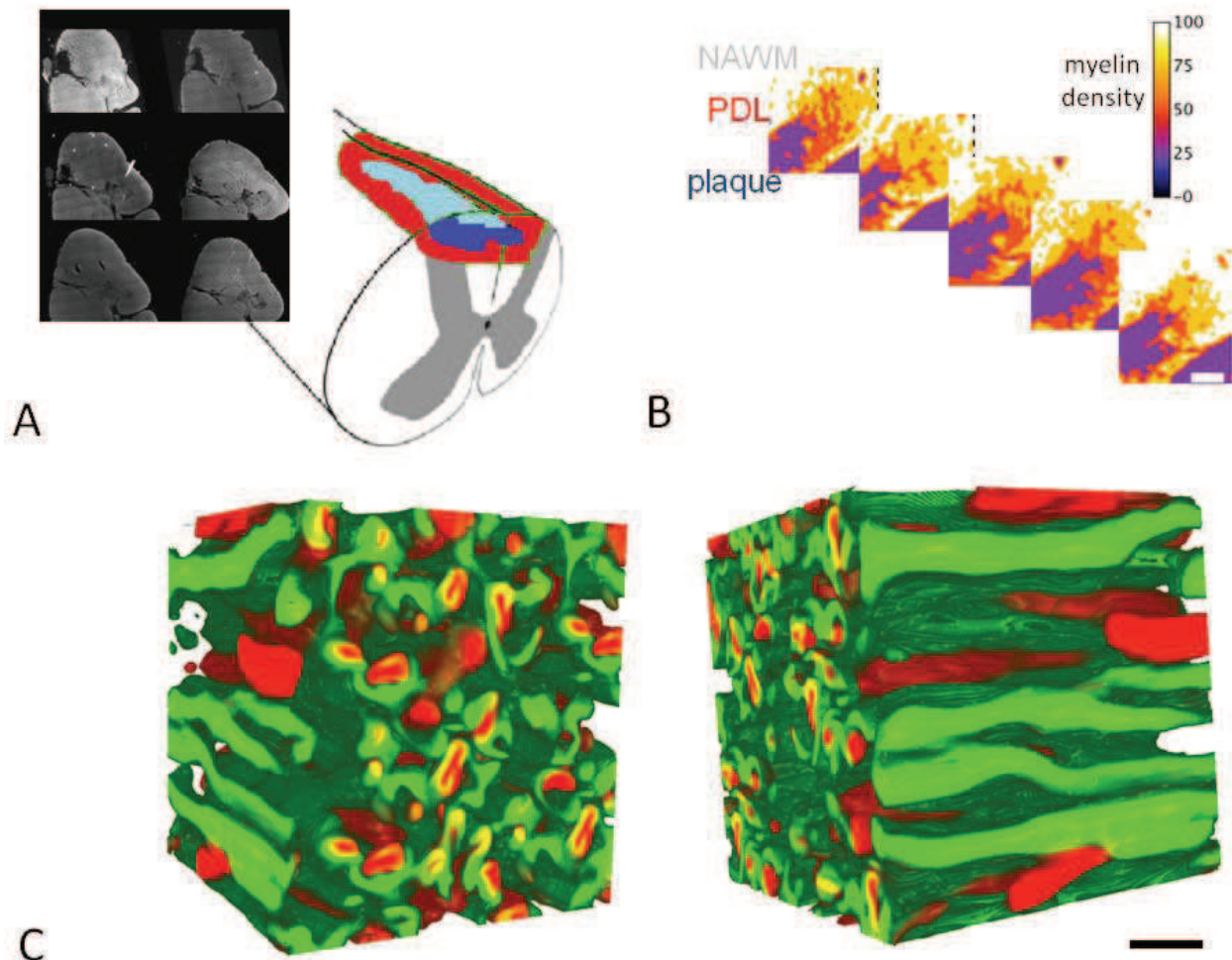


Figure 8: 3D reconstitution and modelisation of PDLs. **A.** Manual reconstitution of a spinal cord lesion (blue) surrounding by PDL areas (red) from mosaic reconstitution of serial MBP immunostained spinal cord sections. **B.** Serial automatic segmentation of the same serial MBP immunostained spinal cord sections. **C.** 3D extrapolation of PDLs at the microscopic level from transverse and longitudinal of MBP(red)/NF (red) double-stained spinal cord sections. Scale bar: 10 μ m.

These data allow visualizing the third dimension (3D) of PDLs in MS spinal cords. Ideally, a 3D reconstitution of PDLs around demyelinated plaques would give information on the potential different mechanisms that lead to transverse or longitudinal extension of PDLs. At the macroscopic level, 3D reconstitution is possible “by hand” (Fig. 8A). However, at the microscopic level, the task is much more challenging. For instance, an automatic segmentation of serial myelin-stained sections at the microscopic level is not obvious because of the difficulty to get homogenous staining on large areas (Fig. 8B). Serial immune-stained sections would therefore be difficult to re-align for 3D reconstitution at the level of axons and myelin sheaths mainly because of artefacts that relate with tissue preservation, cutting and stainings. That is why, we collaborated with Juan-Carlos Prieto and Chantal Revol-Muller from CREATIS platform in order to set up a statistical-based method allowing to reconstitute 3D spinal cord tissue, notably myelin sheaths and axons in PDLs, from a few number of high magnification views of high quality immunostaining. Creating 3D models that represents not only the surface of plaques and PDLs but also the cellular interior with patient-

specific properties is a complex task (Prieto *et al.* 2012a; b). They propose a generic method that allows 3D complex shapes to be reconstructed via an extrapolation process that use signals coded from the analysis of serial 2D sections. Preliminary results are shown in Figure 8C and complete process is described in Prieto *et al.* (2012). However, as the method is not definitely set up to be used on 2D complex microscopic immunostaining views, we were not able to compare NAWM 3D models with PDL ones.

c. PDLs, a widespread phenomenon

As explained before, we focused our histological characterization of PDLs in the cervical spinal cords. However, PDLs were similarly demonstrated in thoracic or lumbar spinal cord sections when performing MOG staining (Fig. 9). Indeed, the screening of MS spinal cord samples revealed the presence of intermediate myelin density areas in large proportion of samples (Table 3 and 4). When partially demyelinated tissues were not obviously associated to demyelinated plaques, they were considered as typical areas of Wallerian degeneration, that is to say, axonal degeneration due to demyelination away from the site of observation. Since we were not able to identify remyelinated areas in our samples and since we excluded typical Wallerian degeneration areas, we proposed that these intermediate myelin density areas surrounding demyelinated plaques are PDLs. During sample screening, sections from a total of 91 spinal cord blocks obtained from 26 MS patients (SPMS or PPMS) were immunostained against MOG. We found that, in a majority of patients (22 out of 26), plaques and PDLs could be observed in all 3 levels or at least 2 distinct levels of the spinal cord (Fig. 9). Importantly, we also assessed the presence of PDLs in a limited number of MS brain samples (*data not shown*) available in the UK MS tissue bank indicating that PDLs are not specific to the spinal cord. However, as previously discussed for spinal cord *vs.* brain lesions, PDLs localized in the spinal cord are more likely to translate into clinical progression than PDLs localized in the brain.

d. PDLs *vs.* NAWM molecular comparisons

To analyse gene expression changes in PDLs, we microdissected PDLs and NAWM samples on 10 MS spinal cords, extracted RNA and analysed their transcriptomic profiles (Fig. 5). After quality controls, we excluded two MS samples. The first analysis we performed in order to explore the dataset of 16 microarrays was a Principal Component Analysis (PCA) (Fujita *et al.* 2008; Ringnér 2008). PCA is a dimension reduction technique used to represent a large data set (54 675 genes) on two dimension plots (Fig. 10A). Each sample, here PDL or NAWM, has complex coordinates constituted of a linear combination of all gene expression values. PCA is a linear

transformation, which maps the data to the most informative orthogonal coordinate system maximizing the distance between two samples. The first (dim 1) and the second (dim 2) principal components are a linear combination of the gene expression values that allow to differentiate the best between the 16 samples. In other words, PCA summarizes the characteristics of the dataset which most contribute to its variance. The PCA plot visually revealed two distinct groups of samples that correspond to PDL and NAWM samples and assessed similarities within one group (Fig. 10A). This observation is the first evidence to suggest that specific cellular mechanisms occur in PDLs.

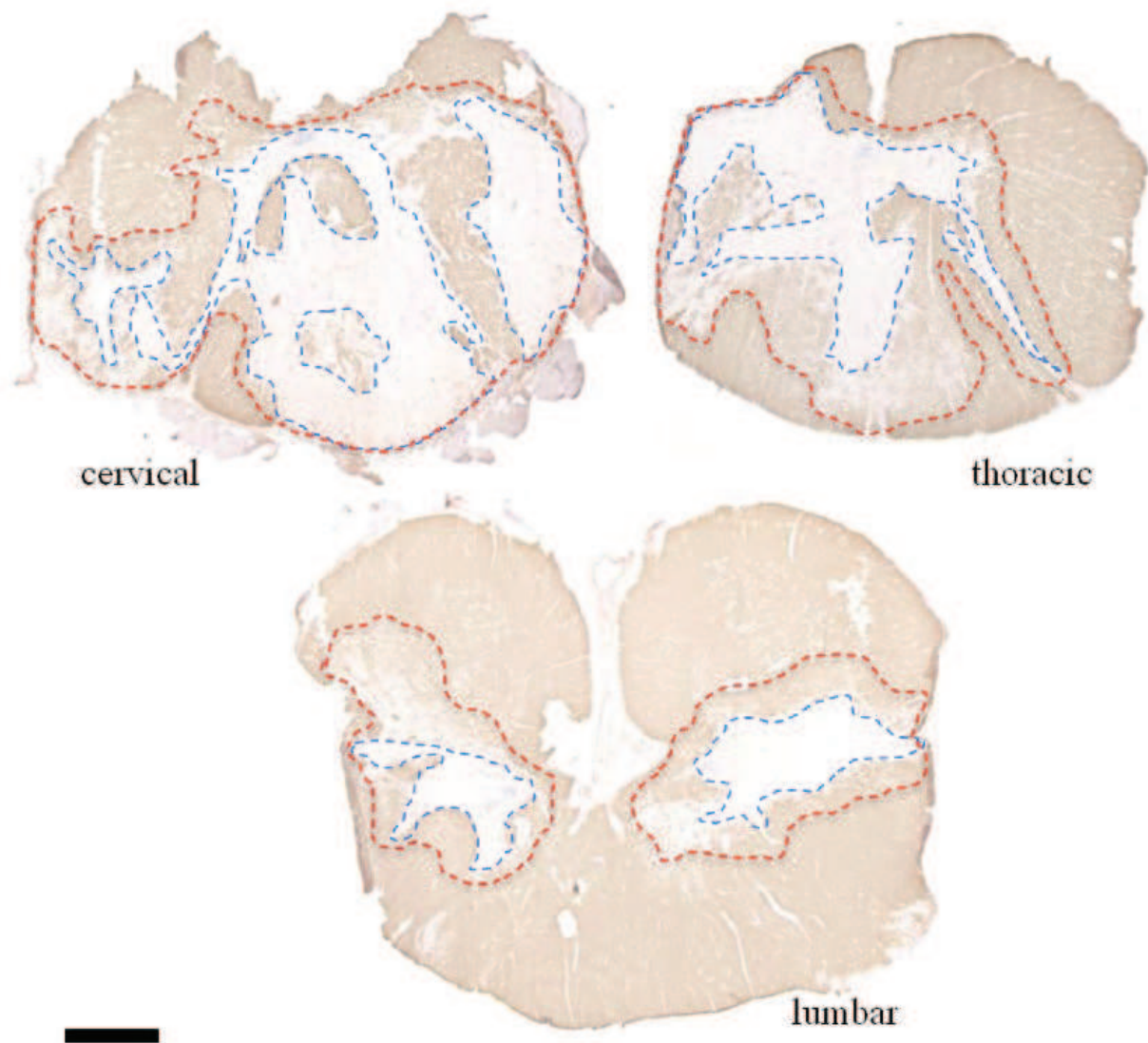


Figure 9: PDLs across the whole spinal cord. Spinal cord blocks obtained from 3 distinct levels (cervical, thoracic and lumbar) were screened for the presence of plaques (blue line) and PDLs (red line). Photomicrographs show representative MOG stainings of cervical, thoracic or lumbar spinal cords derived from patient MS157 (scale bar: 2 mm).

To confirm this point and obtain the first informative set of data on differential gene expression in PDLs vs. associated NAWM from the same MS cases, a two-class paired analysis was performed to compare gene expression using the Significant Analysis of Microarrays (SAM) method (Tusher *et al.* 2001; Bazakos *et al.* 2012). Since PDLs are observed around demyelinated plaques whatever active, chronic active or inactive plaques, we chose the stringent SAM method to determine the most common features of PDLs in the 8 analysed patients. Actually, a relatively few number of up and down-regulated genes were constantly observed in all comparisons (Fig. 10B and Table 9). Of note, in this method, differentially expressed genes were considered significant if the q-value was inferior to 0.10. The q-value parameter estimates the probability of non-random differences between compared samples when the false discovery rate is fixed at 10%. According to this criteria, we found that 124 out of 13 546 transcripts presented a significant differential expression when comparing paired PDL vs. NAWM samples. More specifically, 38 transcripts were up-regulated (green) whereas 86 transcripts were down-regulated (red) in PDLs vs. NAWM (Fig. 10B). Interestingly, among the down-regulated genes in PDLs, myelin-related genes were the most significant, including MBP, MOBP, PLP1 and OLIG1 (Table 9), suggesting demyelination or defective remyelinating processes. Among the up-regulated genes in PDLs, astrocyte-related genes harbored the most significant p-values and included AQP4, CX43 and EAAT1 (Table 9), suggesting a particular genomic status of astrocytes in PDLs. We further confirmed these genomic data at the protein level (see below).

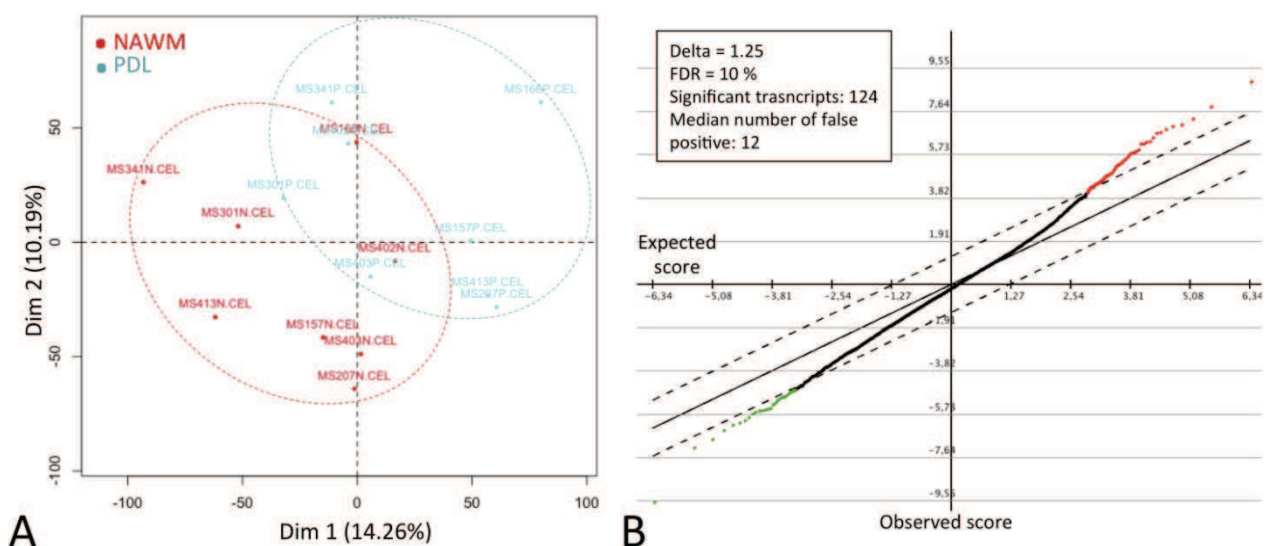


Figure 10: Microarray analyses of PDL vs. NAWM gene expression. **A.** The plot represents the result of a Principal Component Analysis (PCA). Principal component 1 (dim 1) explains 14.26% of the variance between samples and the principal component 2 (dim 2), 10.19%. **B.** The diagram represents results from microarray analysis using the two-class pairwise Significant Analysis of Microarray (SAM) method (false discovery rate of 10%). 124 out of 13 546 transcripts present in PDL and/or NAWM have a significant differential expression when comparing PDL and NAWM samples. 38 transcripts were up-regulated (green) in PDLs vs. NAWM. 86 transcripts were down-regulated (red) in PDLs vs. NAWM.

Table 9: Differentially expressed genes in PDLs vs. NAWM (SAM analysis)

Gene Symbol	Description	q-value (%)	Mean ratio	SD ratio	Patients concerned (/8)
Up-regulated genes in PDLs vs. NAWM					
GOLM1	Golgi membrane protein 1	0.00	2.08	0.71	8
ABCE1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP). member 1	6.51	1.97	0.57	8
AQP4	Aquaporin 4	6.51	2.06	1.70	8
B3GAT2	Beta-1.3-glucuronyltransferase 2 (glucuronosyltransferase S)	6.51	2.05	1.44	8
CPE	Carboxypeptidase E	6.51	2.05	0.68	8
IGFBP7	Insulin-like growth factor binding protein 7	6.51	1.72	0.51	8
IPO8	Importin 8	6.51	1.82	0.54	8
MRPL19	Mitochondrial ribosomal protein L19	6.51	2.95	1.96	8
NBN	Nibrin	6.51	1.788	0.36	8
PDIA6	Protein disulfide isomerase family A, member 6	6.51	1.68	0.47	8
PNMA2	Paraneoplastic antigen MA2	6.51	2.11	0.66	8
PPP3CA	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit. alpha isoform	6.51	4.21	3.56	8
SPARCL1	SPARC-like 1 (hevin)	6.51	1.65	0.38	8
TMEM47	Transmembrane protein 47	6.51	1.95	0.46	8
BAALC	Brain and acute leukemia. cytoplasmic	6.73	1.35	0.20	8
RCN1	Reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain	7.81	2.34	0.95	8
UXS1	UDP-glucuronate decarboxylase 1	7.81	2.18	0.91	8
PRPS1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	8.32	1.56	0.49	8
RBM17	RNA binding motif protein 17	8.62	1.90	0.57	8
FOXN3	Forkhead box N3	8.81	1.89	0.73	8
GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1	8.81	1.41	0.28	8
NAT8L	N-acetyltransferase 8-like (GCN5-related. putative)	8.81	2.07	1.32	8
NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	8.81	1.98	0.70	7
ZHX2	Zinc fingers and homeoboxes 2	8.81	2.61	0.87	8
AK3L1	Adenylate kinase 3-like 1	9.19	1.47	0.25	8
GJA1	Gap junction protein. alpha 1, 43kDa	9.19	3.15	3.77	8
NR2F1	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	9.19	2.42	1.22	8
SERPING1	Serpin peptidase inhibitor. clade G (C1 inhibitor), member 1	9.19	2.35	1.07	8
SLC1A3	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3 (EAAT1)	9.19	1.51	0.47	7
SORBS1	Sorbin and SH3 domain containing 1	9.19	1.60	0.45	7
SCP2	Sterol carrier protein 2	9.37	1.23	0.13	7
ACTR2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	9.75	1.69	0.47	7
ANK2	Ankyrin 2, neuronal	9.75	2.01	0.74	7
ZFP36L1	Zinc finger protein 36, C3H type-like 1	9.77	1.87	0.55	7
Down-regulated genes in PDLs vs. NAWM					
ANLN	Anillin. actin binding protein	0.00	0.63	0.15	8
CBFA2T2	Core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to 2	0.00	0.70	0.09	8
EDF1	Endothelial differentiation-related factor 1	0.00	0.67	0.07	8
MBP	Myelin basic protein	0.00	0.56	0.12	8
MOBP	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	0.00	0.45	0.17	8
NDRG1	N-myc downstream regulated 1	0.00	0.63	0.13	8
NRXN1	Neurexin 1	0.00	0.26	0.20	8
PAQR6	Progesterin and adipoQ receptor family member VI	0.00	0.60	0.12	8
PEX5L	Peroxisomal biogenesis factor 5-like	0.00	0.53	0.16	8
PKP4	Plakophilin 4	0.00	0.52	0.22	7
RAPGEF5	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	0.00	0.55	0.17	8
RPL37A	Ribosomal protein L37a	3.36	0.72	0.12	8
EEF1A1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	3.67	0.86	0.08	8
PACS2	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2	4.04	0.55	0.17	8
RPS6	Ribosomal protein S6	4.04	0.84	0.07	8
SCD	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	4.04	0.64	0.16	8
SIRT2	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2 (<i>S. cerevisiae</i>)	4.04	0.60	0.15	8
TMEM63A	Transmembrane protein 63A	4.04	0.44	0.12	8
TP53INP2	Tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	4.89	0.53	0.17	8
BCAS1	Breast carcinoma amplified sequence 1	5.21	0.55	0.21	8
CINP	Cyclin-dependent kinase 2 interacting protein	5.51	0.66	0.13	8
FTHL5	Ferritin. heavy polypeptide-like 5	5.51	0.71	0.14	8
PDHA1	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	5.51	0.63	0.22	8
PLP1	Proteolipid protein 1	5.51	0.71	0.13	7

OLIG1	Oligodendrocyte transcription factor 1	5.57	0.43	0.20	8
FMNL2	Formin-like 2	6.21	0.61	0.18	8
LPAR1	Lysophosphatidic acid receptor 1	6.21	0.65	0.17	8
MRFAP1	Mof4 family associated protein 1	6.21	0.79	0.10	8
SOX2OT	SOX2 overlapping transcript (non-protein coding)	6.21	0.63	0.15	8
PEA15	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	6.55	0.58	0.16	8
SCCPDH	Saccharopine dehydrogenase (putative)	6.59	0.65	0.16	8
FEZ1	Fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)	6.89	0.55	0.21	8
OTUD7B	OTU domain containing 7B	6.89	0.63	0.14	8
RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2	6.89	0.50	0.22	8
SAP18	Sin3A-associated protein, 18kDa	6.89	0.65	0.20	8
TMEM59	Transmembrane protein 59	6.89	0.66	0.17	7
TRAK2	Trafficking protein, kinesin binding 2	6.89	0.59	0.25	8
RPS26	Ribosomal protein S26	7.02	0.62	0.12	8
CLTA	Clathrin, light chain (Lca)	7.12	0.67	0.18	7
ASPHD1	Aspartate beta-hydroxylase domain containing 1	7.23	0.49	0.19	8
BVES	Blood vessel epicardial substance	7.23	0.52	0.21	8
LHPP	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	7.23	0.59	0.18	8
AGFG1	ArfGAP with FG repeats 1	7.54	0.54	0.17	8
DNAH17	Dynein, axonemal, heavy chain 17	7.54	0.40	0.23	8
ITPK1	Inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	7.54	0.66	0.18	8
KIAA1598	KIAA1598	7.54	0.59	0.21	8
MAP4	Microtubule-associated protein 4	7.73	0.72	0.15	8
CNPY2	Canopy 2 homolog (zebrafish)	7.78	0.31	0.22	8
FA2H	Fatty acid 2-hydroxylase	7.81	0.59	0.14	8
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	7.81	0.61	0.14	8
PLEKHB1	Pleckstrin homology domain containing. family B (evectins) member 1	7.81	0.71	0.18	8
SLC17A5	Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	7.81	0.47	0.27	8
CPD	Carboxypeptidase D	8.07	0.58	0.13	8
PRDX4	Peroxiredoxin 4	8.16	0.58	0.23	8
SPOCK3	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3	8.41	0.49	0.13	8
BACE1	Beta-site APP-cleaving enzyme 1	8.62	0.60	0.22	8
RPL38	Ribosomal protein L38	8.73	0.66	0.14	8
NENF	Neuron derived neurotrophic factor	9.21	0.58	0.19	8
NLGN3	Neuroigin 3	9.29	0.56	0.23	8

Differentially expressed genes obtained after the two-class pairwise Significant Analysis of Microarray (false discovery rate of 10%). First part presents the 38 transcripts up-regulated and the 86 ones down-regulated in PDLs vs. NAWM. Green genes are obvious astrocyte-related genes whereas red genes are oligodendrocyte-related genes. Data are presented as mean ratio values of 8 analysed MS patients comparing PDLs to associated NAWM. SD: standard deviation. Last column indicates the number of patients for which expression ratio (PDL/NAWM expression) is superior to 1 or inferior to 1, meaning the number of patients for which the up-regulation or the down-regulation are respectively observed.

e. Myelinic and axonal alterations of PDLs

To quantitatively assess the extent of demyelination in PDLs, we compared myelin density in PDLs vs. NAWM on MBP-stained sections (Fig. 11A-B). We found a mean myelin loss of nearly 44% in PDLs compared to the NAWM (NAWM: 0.71 ± 0.020 ; PDL: 0.39 ± 0.024 ; $p = 2.5 \cdot 10^{-10}$, Wilcoxon test; Fig. 11C). Axonal density, as assessed by the number of NF^+ axons/ mm^2 , was lower in PDLs ($6114 \pm 606 /mm^2$) compared to the NAWM ($7938 \pm 605 /mm^2$; $p = 0.030$, Wilcoxon test; Fig. 11D). However, relative myelin loss predominated over axonal loss in PDLs (44% for myelin loss vs. 16% for axonal loss) and apparently unaltered demyelinated axons were demonstrated (Fig. 11B), indicating again that Wallerian degeneration is not likely to be a primary cause of PDL formation. In addition, the mean diameter of myelinated axons was unchanged in

PDLs as compared to the NAWM ($3.1 \pm 0.073 \mu\text{m}$ and $3.3 \pm 0.12 \mu\text{m}$ in the NAWM and PDLs respectively, $p = 0.56$, Wilcoxon test; Fig. 11F). Finally, myelinated axons in PDLs did not have abnormally thin myelin sheaths (Fig. 11E), which confirms that PDLs are distinct from the remyelinated areas previously demonstrated in close vicinity to plaque borders (Prineas & Connell 1979; Patrikios *et al.* 2006). In the same way, using CRMP5 as an oligodendrocytes marker (Ricard *et al.* 2000; Marignier *et al.* 2010), we observed a decreased density of mature oligodendrocytes in PDLs compared to the NAWM (Fig. 12). To further analyse PDL molecular alterations and identify additional differentially expressed genes that could relate with oligodendrocytes and/or astrocytes, a classical non-parametric Wilcoxon test was used as a less stringent method than SAM. Differentially expressed myelin-related genes were identified on the basis of literature and GO ontology (Table 10). As expected, the expression of mature oligodendrocyte gene markers, including MBP, MOBP and PLP, was down-regulated in PDLs vs. NAWM. Interestingly, the expression of immature oligodendrocyte gene markers, as OLIG1, was similarly down-regulated and, moreover, none of the up-regulated genes in PDLs were myelin-related ones (Table 10).

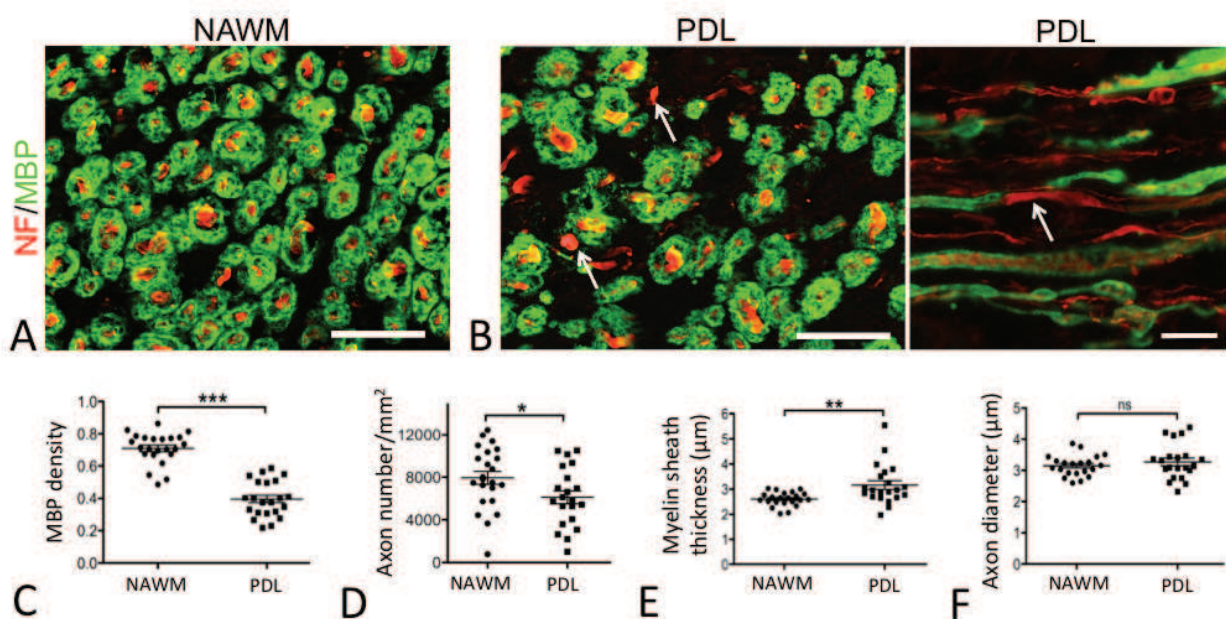


Figure 11: Myelin and axonal alterations in the PDL of MS spinal cords. A, B. Representative photomicrographs of double immunostainings against MBP (green) and NF (red) performed on spinal cord sections from a progressive MS patient. As compared to the NAWM (A), white matter in the PDL (B) presents a spongy morphology. Apparently non dystrophic axons are demyelinated (arrows in transversal and longitudinal sections) (scale bar: 25 μm). C. Comparison of MBP staining densities in NAWM vs. PDL ($p\text{-value} = 2.5 \cdot 10^{-10}$). D. Comparisons of mean axonal densities in the NAWM vs. PDL ($p\text{-value} = 0.030$). E. Mean myelin sheath thicknesses of myelinated axons were compared between PDL and NAWM. Mean thicknesses were not found to be lower in PDL as compared to the NAWM, but on the contrary, reached significantly higher values ($p\text{-value} = 0.0029$). F. Mean axonal diameters of myelinated axons were measured and compared between PDL and NAWM. No difference was observed regarding mean axon diameters ($p\text{-value} = 0.56$).

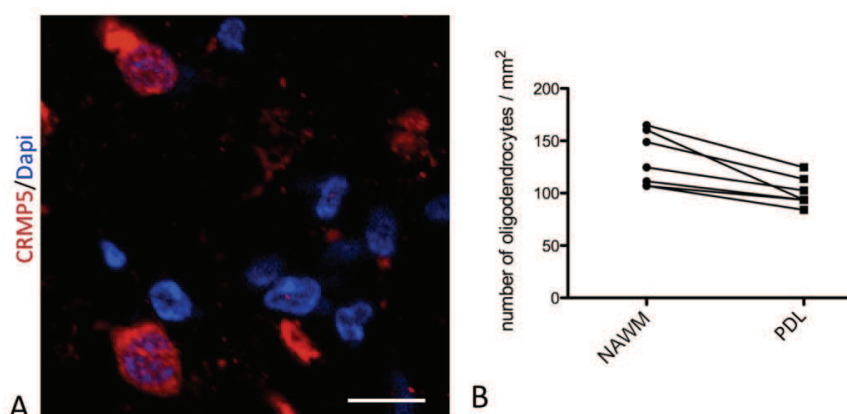


Figure 12: Oligodendrocyte observations in PDLs of MS spinal cords. The density of CRMP-5⁺ mature oligodendrocytes was assessed in PDLs of MS spinal cords. **A.** Photomicrograph shows a representative CRMP-5 (red) immunostaining observed in PDLs. Nuclei are counterstained in blue with DAPI (scale bar: 15 μm). **B.** To measure the density of oligodendrocytes, images from selected areas were

digitally photographed and analyzed following MBP/CRMP5 double immunostaining. A region of interest (ROI) was first defined (50 000 μm²) in each area analyzed (periplaque and NAWM). CRMP5⁺/nuclei⁺ cell bodies were then counted and indexed to the total area covered by the ROI. For each area analyzed (PDL and NAWM), each data represents a mean percentage of values obtained from 6 distinct ROI. Data shows that oligodendrocyte density was significantly lower in PDLs compared to the NAWM (p-value = 0.016, Wilcoxon test).

Table 10: Myelin-related genes differentially expressed in PDL vs. NAWM.

Gene symbol	Description	Mean ratio	SD	p-value
Down-regulated				
SIRT2*	Sirtuin 2	0.61	0.15	0.01
NDRG1*	N-myc downstream regulated 1	0.63	0.13	0.01
LPAR1*	Lysophosphatidic acid receptor 1	0.65	0.17	0.01
JAM3	Junctional adhesion molecule C	0.67	0.16	0.01
CLDN11	Claudin 11	0.67	0.18	0.01
NRXN1*	Neurexin 1	0.26	0.20	0.01
OLIG1*	Oligodendrocyte transcription factor 1	0.44	0.20	0.01
MOBP*	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	0.45	0.17	0.01
MBP*	Myelin basic protein	0.56	0.12	0.01
CNTN2	Contactin 2	0.58	0.23	0.01
FA2H*	Fatty acid 2-hydroxylase	0.59	0.14	0.01
KLK6	Kallikrein-related peptidase 6	0.61	0.26	0.02
UGT8	UDP glycosyltransferase 8	0.61	0.27	0.02
MYRF	Myelin regulatory factor	0.62	0.26	0.02
CNP	CNPase	0.64	0.20	0.02
TUBB4	Tubulin beta 4	0.68	0.21	0.02
PLP1*	Proteolipid protein 1	0.71	0.14	0.02
QKI	Protein quaking	0.51	0.34	0.02
NKX2-2	NK2 homeobox 2	0.54	0.38	0.02
GJC2	Connexin 47	0.57	0.30	0.02
MYO5A	Myosin 5 A	0.59	0.35	0.02
BOK	Bcl-2-related ovarian killer protein	0.64	0.48	0.05
SOX8	Transcription factor SOX8	0.69	0.63	0.05
ERMN	Juxtalin	0.72	0.29	0.05
POU3F2	POU class 3 homeobox 2	0.72	0.38	0.05
Up-regulated				
None				

Data are presented as mean ratio values obtained from the paired comparisons of gene expression levels in microdissected PDL vs. NAWM regions of 8 MS spinal cords. Among the significantly up or down-regulated genes in PDL vs. NAWM, myelin-related genes were identified using GO ontology and a survey of the literature. Note that no myelin-related genes were identified among up-regulated genes. SD: standard deviation. *: genes showing significant down-regulation in 2 concurrent methods of analysis (Significant Analysis of Microarray method and Wilcoxon signed rank test). p-values obtained with the Wilcoxon test are indicated in the right column.

6) Macrophagic/microglial response in PDLs

a. Macrophagic and microglial accumulation

We previously showed that in spinal cords from PPMS or SPMS patients, parenchymal CD3⁺ T-cells are sparse, except in active plaques (Androdias *et al.* 2010). Therefore, we focused our histological analysis on macrophages/microglia and found a higher density of Iba-1⁺ macrophages/microglia in PDLs (0.061±0.0078) compared to the NAWM (0.036±0.0030; $p = 0.0056$, Wilcoxon test; Fig. 13A). Interestingly, the density of macrophages/microglia in PDLs was not correlated with the activity of associated plaques (chronic silent: 0.056±0.015; chronic active: 0.069±0.010; active: 0.056±0.0010; $p = 0.30$, Kruskal-Wallis test; Fig. 13B). Analysis by confocal microscopy showed that macrophages/microglia were frequently apposed to myelin sheaths and that phagocytosis of myelin debris could occasionally be demonstrated (Fig. 13C). This observation was confirmed by the ORO (Oil red-O) staining of rare macrophages/microglia in PDLs (*data not shown*). In contrast, phagocytosis of axons was not observed in PDLs (Fig. 13E). Of note, the density of macrophages/microglia negatively correlated with myelin density ($r = -0.57$; $p = 0.0061$; Fig. 13D) but not with axonal density ($r = 0.39$; $p = 0.076$, Spearman rank correlation test; Fig. 13F), indicating that accumulation of macrophages/microglia did not appear to be linked to axonal loss in PDLs.

b. Microglial nodules are frequent in PDLs

Microglial nodules have been observed in neurologic AIDS (Kato *et al.* 1987; Nebuloni *et al.* 2000) and recently in the NAWM of MS patients (Prineas *et al.* 2001; Barnett *et al.* 2009a). However, their pathogenic roles have not been established definitely. To further characterize microglial nodules within MS lesions and their possible involvement in the progression of tissue alterations, we analysed their presence and their relationship with PDLs using Iba-1 immunostaining. Considering the apposition of more than five Iba-1⁺ cells as a microglial nodule, we first noticed that microglial nodule formation is relatively common in MS spinal cord. Actually, microglial nodules, up to 9 per section, were observed on 14 out 16 spinal cord sections (Fig. 14A). Interestingly, we observed a higher frequency of microglial nodules in PDLs compared to the NAWM and plaques of the section (Fig. 14B). To determine whether the formation of microglial nodule resulted from microglial proliferation, we performed a Ki-67 staining (which label proliferating cells). As Ki-67 immunostaining was negative on the whole spinal cord sections (Fig. 14C), microglial nodules are likely to result from microglia aggregation. In support to this finding, the area surrounding microglial nodules are frequently devoid of microglia suggesting cell migration toward the nodule (Fig. 14D). We could not demonstrate that microglial nodules are

involved in PDL formation. However, they may represent a local source of immune mediators as detected in our microarray study.

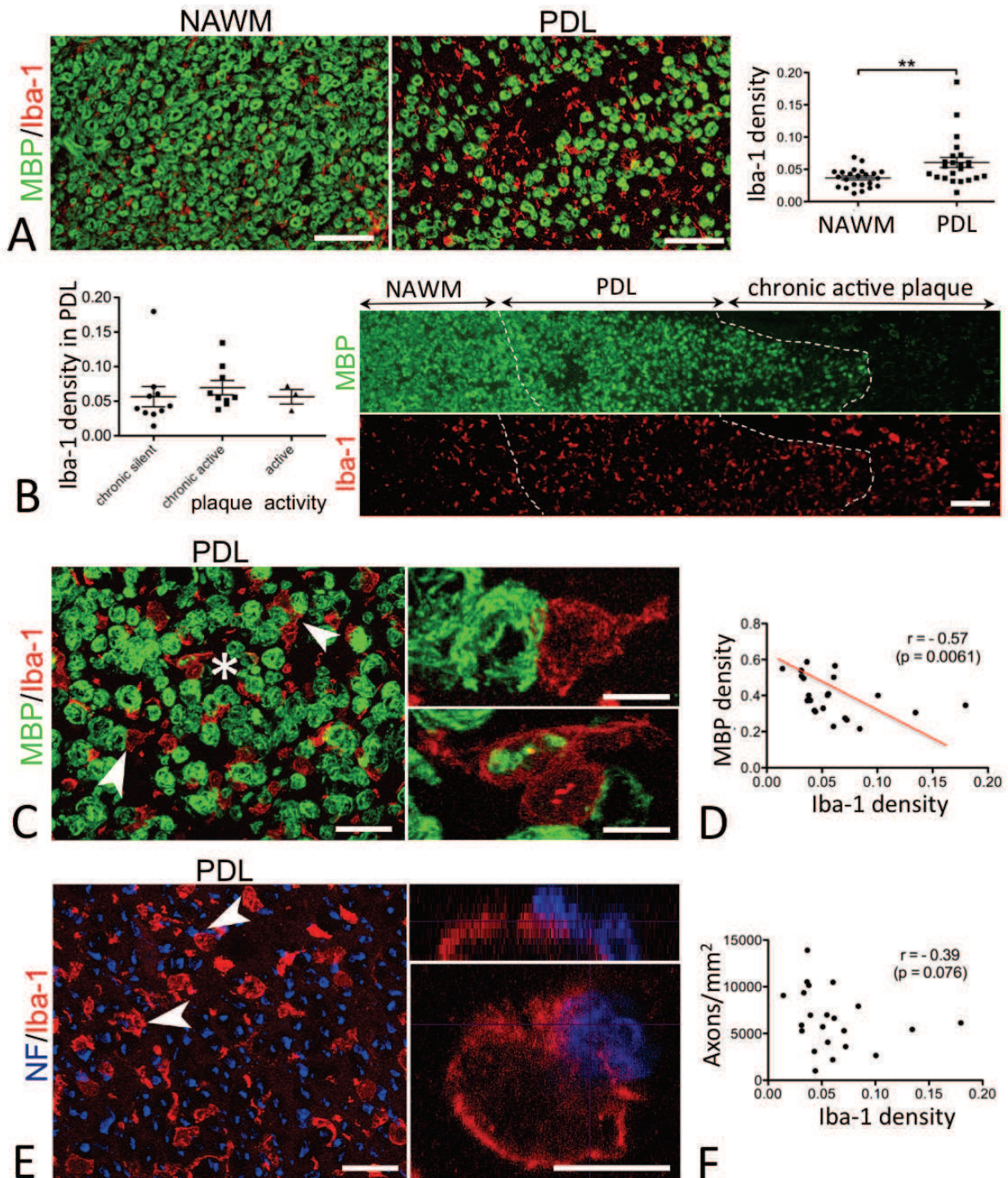


Figure 13: Accumulation of macrophages/microglia in the PDL of MS spinal cords. **A.** Photomicrographs show a representative Iba-1 (red)/MBP (green) double immunostaining observed in NAWM and adjacent PDL regions (scale bars: 100 μ m). A higher density of macrophages/microglia is observed in PDL as compared to the NAWM (right panel) (p -value = 0.0056). **B.** Macrophages/microglia density in the PDL appears independent from the activity of associated plaques (left panel, p -value = 0.30). Photomicrograph in right panel shows a representative Iba-1 (red)/MBP (green) double immunostaining of PDL associated to a chronic active plaque (scale bars: 100 μ m). Note that fully activated macrophages/microglia harbouring a hypertrophied rounded cell body are observed in plaque borders but not in the PDL. **C.** Photomicrograph in left panel shows a representative view of Iba-1 (red)/MBP (green) double immunostaining in a PDL region (scale bar: 25 μ m). Close appositions between Iba-1⁺ macrophage/microglial cells and MBP⁺ myelin sheaths are observed (arrows) and an Iba-1⁺

macrophage/microglial cell having engulfed MBP⁺ myelin debris is demonstrated (star). Right panels show higher magnification views of these areas (scale bar: 10 μ m). **D.** Densities of macrophages/microglia and myelin are inversely correlated in PDL ($\rho = -0.57$, p -value = 0.0061). **E.** Photomicrograph shows a representative Iba-1 (red)/NF (blue) double immunostaining observed in a PDL region. Arrows indicate very close appositions between Iba-1⁺ cells and NF⁺ dystrophic axons (scale bar: 25 μ m). A high magnification view of an Iba-1⁺ macrophage/microglial cell in close apposition with a NF⁺ dystrophic axon is shown in insert (scale bar: 10 μ m). A z view of the same image (upper right panel) demonstrates close apposition but no engulfment of NF⁺ material by the Iba-1⁺ macrophage/microglial cell. These data indicate that macrophages/microglia do not exert phagocytic activity toward axons in PDL regions. **F.** Densities of macrophages/microglia and axons were neither negatively nor positively correlated in PDLs ($\rho = -0.39$, p -value = 0.076).

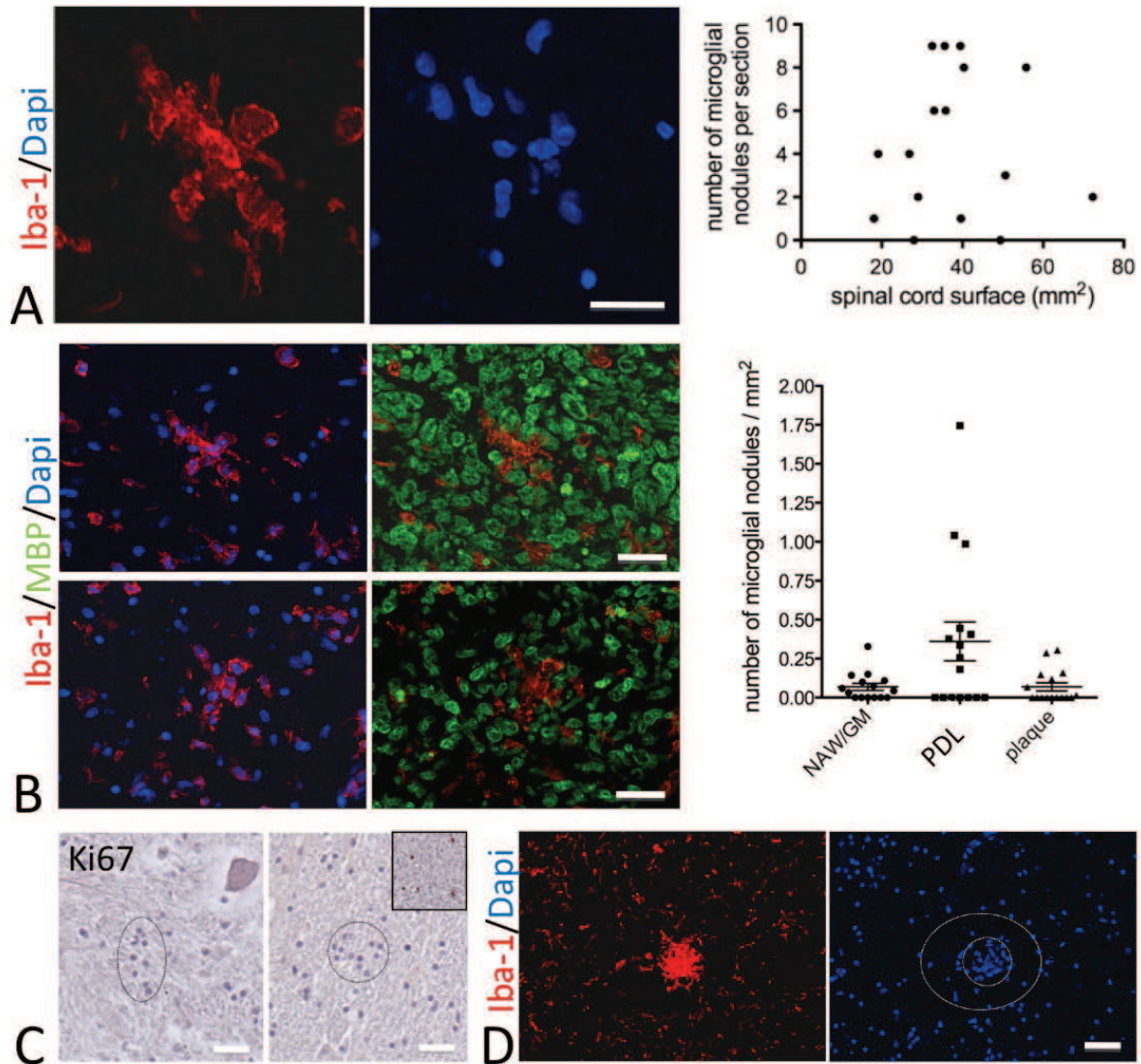


Figure 14: Microglial nodules are frequent in PDLs. **A.** Photomicrographs show a representative Iba-1 (red)/Dapi (blue) immunostaining of a microglial nodule observed on spinal cord sections. Right panels indicate the relative number of microglial nodules observed. Up to 9 microglial nodules were observed per spinal cord section (scale bars: 50 μ m). **B.** Photomicrographs show representative Iba-1 (red)/MBP (green)/Dapi (blue) immunostainings of microglial nodules observed in the NAWM (upper panels) and in the PDL (lower panel) (scale bars: 50 μ m). A higher density of microglial nodules is observed in PDLs as compared to the NAWM and associated plaques (right panel). **C.** Photomicrographs show representative Ki-67 immunostainings of microglial nodules observed on spinal cord sections (scale bars: 50 μ m). **D.** Photomicrographs show a representative Iba-1 (red)/Dapi (blue) immunostaining of a microglial nodule that harbours an empty space around aggregated Iba-1⁺ cells (scale bars: 25 μ m).

7) Inflammation and glial remodeling in PDLs

a. A low-grade inflammatory process occurs in PDLs

The analysis of microarrays using the Wilcoxon test as method to identify differentially expressed genes showed that a large set of immune-related genes was up-regulated in PDLs vs. NAWM (Table 11 and 12). In contrast, few immune-related genes were found to be down-regulated in PDLs vs. NAWM (Table 12). These data confirm, at the molecular level, that inflammation predominates in PDLs over the adjacent NAWM. Up-regulated immune-related genes notably comprised components of the complement system (eg. C1S, C4A, C4B, C7), the HLA-DR beta MHC class II molecule, the Toll-like receptors TLR4 and TLR7, as well as the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7. Of note, 3 cytokines were identified as up-regulated in PDLs: the anti-inflammatory cytokine IL-27, the mast cell growth factor SCF (Stem Cell Factor) and the B-cell growth and differentiation factor APRIL. Finally, when performing gene enrichment analysis using the TargetMine software, we found that the TGF- β signalling pathway ($p = 0.03$) and the Interferon- γ signalling pathway ($p = 0.001$) were enriched in PDLs. Immunostaining confirmed the up-regulation of CXCR4, CD163 and TGF β R3 in PDLs (Fig. 15).

Table 11: Immune-related genes differentially expressed in PDL vs. NAWM.

Gene symbol	Description	Mean ratio	SD	p-value
Up-regulated				
<i>Complement system</i>				
C1S	Complement component 1, S subcomponent	3.53	2.51	0.01
C4A	Complement component 4A	1.80	0.57	0.01
C4B	Complement component 4B	1.70	0.53	0.01
C7	Complement component 7	3.12	2.50	0.04
CLU	Complement cytolysis inhibitor	2.15	1.15	0.01
CFI	Complement factor I	6.90	13.49	0.02
CD59	CD59 molecule	1.65	1.06	0.02
CD69	CD69 molecule	4.68	4.86	0.02
SERPING1	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	2.35	1.07	0.01
<i>TLR</i>				
TLR5	Toll-like receptor 5	3.53	5.56	0.05
TLR7	Toll-like receptor 7	1.73	1.36	0.02
<i>Cytokines</i>				
IL17D	Interleukin 17D (also known as IL-27)	3.44	3.45	0.01
KITLG	KIT ligand (also known as Stem Cell Factor)	2.71	2.52	0.01
TNFSF13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13 (APRIL)	1.74	1.20	0.05
<i>Cytokine/chemokine receptors</i>				
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2.64	1.66	0.02
CXCR7	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7	7.19	9.12	0.01
IL17RD	Interleukin 17 receptor D (isoform D of IL17A receptor)	3.62	2.93	0.01
IL13RA1	Interleukin 13 receptor alpha 1	1.53	0.56	0.05
IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I	14.71	33.32	0.05
OSMR	Oncostatin M receptor	7.49	15.48	0.05
TGFBR3	Transforming growth factor beta receptor III	7.10	9.29	0.02
<i>TGF-β receptor signaling*</i>				
BMPRI1A	Bone morphogenetic protein receptor, type IA (ALK3)	4.96	4.18	0.04
BMPRI1B	Bone morphogenetic protein receptor, type IB (ALK6)	28.58	75.02	0.02

CUL1	Cullin 1	5.28	8.37	0.01
KLF10	TGFB inducible early growth response	17.27	40.37	0.02
ROCK2	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	1.98	1.13	0.02
SMAD5	SMAD family member 5	1.88	0.71	0.04
SMAD1	SMAD Family Member 1	29.43	69.56	0.02
TAB2	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2	1.90	1.08	0.01
TGFB1	Transforming growth factor beta induced	4.29	6.92	0.02
<i>Interferon-γ signaling*</i>				
GBP1	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible	5.29	9.85	0.05
GBP2	Guanylate binding protein 2, interferon-inducible	1.85	0.94	0.05
GBP3	Guanylate binding protein 3	14.66	34.71	0.04
HLA-DRB1,3	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1, 3	2.13	0.90	0.05
HLA-DRB4,5	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 4, 5	2.42	1.61	0.04
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	1.85	0.96	0.01
<i>Cell activation</i>				
CD163	CD163	3.21	1.56	0.01
CD44	CD44	1.73	0.76	0.01
CD58	CD58	5.42	4.52	0.04
CD99	CD99	1.70	0.73	0.02
<i>Cell adhesion</i>				
CADM1	Cell adhesion molecule 1	4.14	5.30	0.04
ITGA6	Integrin, alpha 6	2.17	1.17	0.04
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	3.38	2.84	0.02

Data are presented as mean ratio values obtained from the paired comparisons of gene expression levels in microdissected PDL vs. NAWM regions of 8 MS spinal cords. Among the significantly up or down-regulated genes in PDL vs. NAWM, immune-related genes were identified using GO ontology and a survey of the literature. A selection of up-regulated immune-related genes is presented here. Only few immune-related genes were identified among down-regulated genes and are presented in table 12. SD: standard deviation. *: pathways showing significant enrichment using the TargetMine software. p-values obtained with the Wilcoxon test are indicated in the right column.

Table 12: Complete list of immune-related genes differentially expressed in PDL vs. NAWM.

Gene symbol	Description	Mean ratio	SD	p-value
Up-regulated				
ABCF1	TNF-Alpha-Stimulated ABC Protein2	4.09	5.90	0.05
ACTR2	Actin-Related Protein 2	1.69	0.47	0.02
ADCY2	Adenylate Cyclase 2 (Brain)	2.54	2.48	0.01
ANXA1	Annexin A1	3.39	1.62	0.02
APC	Adenomatous Polyposis Coli	3.26	3.10	0.01
ARPC1A	Actin Related Protein 2/3 Complex. Subunit 1A	5.23	8.26	0.01
ATF2	Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein 2 (CREB2)	1.83	1.00	0.04
BMPR1A	Bone Morphogenetic Protein Receptor. Type IA (ALK3)	4.96	4.18	0.04
BMPR1B	Bone Morphogenetic Protein Receptor. Type IB (ALK6)	28.58	75.02	0.02
BTN3A2	Butyrophilin Protein	5.72	10.78	0.01
C1S	Complement Component 1. S Subcomponent	3.53	2.51	0.01
C4A	Complement Component 4A	1.80	0.57	0.01
C4B	Complement Component 4B	1.70	0.53	0.01
C7	Complement component 7	3.12	2.50	0.04
CADM1	Cell adhesion molecule 1	4.14	5.30	0.04
CANX	Calnexin	2.07	1.00	0.04
CD163	CD163 molecule	3.21	1.56	0.01
CD44	CD44 molecule	1.73	0.76	0.01
CD58	CD58 molecule	5.42	4.52	0.04
CD59	CD59 molecule	1.65	1.06	0.02
CD69	CD69 molecule	4.68	4.86	0.02
CD99	CD99 molecule	1.70	0.73	0.02
CEBPA	CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP). Alpha	1.82	1.02	0.02
CFI	Complement Factor I	6.90	13.49	0.02
CLEC4A	C-Type Lectin Domain Family 4. Member A	55.13	88.77	0.02
CLEC5A	Myeloid DAP12-Associating Lectin-1	4.69	3.52	0.04
CLU	Complement Cytolysis Inhibitor	2.15	1.15	0.01
CREB1	CAMP Responsive Element Binding Protein 1 (CREB1)	9.57	14.88	0.02
CUL1	Cullin 1	5.28	8.37	0.01
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2.64	1.66	0.02
CXCR7	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7	7.19	9.12	0.01

CYLD	Cylindromatosis (Turban Tumor Syndrome)	4.08	5.24	0.02
EDNRA	Endothelin Receptor Type A	56.51	131.3	0.02
EDNRB	Endothelin Receptor Type B	3.30	4.21	0.01
FN1	Fibronectin 1	2.09	1.32	0.04
FYB	FYN Binding Protein	14.97	34.86	0.04
GBP1	Guanylate Binding Protein 1. Interferon-Inducible	5.29	9.85	0.05
GBP2	Guanylate Binding Protein 2. Interferon-Inducible	1.85	0.94	0.05
GBP3	Guanylate Binding Protein 3	14.66	34.71	0.04
GIMAP1	GTPase. IMAP Family Member 1	4.68	5.08	0.04
HIPK1	Homeodomain Interacting Protein Kinase 1	1.55	0.79	0.04
HIST1H4E	Histone Cluster 1. H4e	1.77	0.84	0.04
HLA-DRB1.3	Major histocompatibility complex. class II. DR beta 1. 3	2.13	0.90	0.05
HLA-DRB4.5	Major histocompatibility complex. class II. DR beta 4. 5	2.42	1.61	0.04
HOXB6	Homeobox B6	2.44	2.39	0.02
HSPA1A/B	Heat Shock 70kDa Protein 1A/B	1.73	0.57	0.02
IL13RA1	Interleukin 13 receptor. alpha 1	1.53	0.56	0.05
IL17D	Interleukin 17D	3.44	3.45	0.01
IL17RD	Interleukin 17 receptor D	3.62	2.93	0.01
IL1R1	Interleukin 1 receptor. type I	14.71	33.32	0.05
IRS1	Insulin Receptor Substrate 1	2.35	1.98	0.05
ITGA6	Integrin. Alpha 6	2.17	1.17	0.04
ITPKB	Inositol-Trisphosphate 3-Kinase B	1.71	0.79	0.04
JAK3	Janus Kinase 3	1.86	1.16	0.05
KITLG	KIT Ligand	2.71	2.52	0.01
KLF10	TGF β Inducible Early Growth Response	17.27	40.37	0.02
KLF6	Kruppel-Like Factor 6	3.30	3.88	0.04
MAPK10	Mitogen-Activated Protein Kinase 10	1.51	0.58	0.04
NLRP1	NLR Family. Pyrin Domain Containing 1	2.83	3.86	0.02
NPEPPS	Aminopeptidase Puromycin Sensitive	2.75	1.83	0.01
OSMR	Oncostatin M Receptor	7.49	15.48	0.05
OSTM1	Osteopetrosis Associated Transmembrane Protein 1	2.34	1.23	0.01
PAK1	P21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 1	4.85	5.58	0.02
PBX1	Pre-B-Cell Leukemia Homeobox 1	1.80	0.74	0.01
PCID2	PCI Domain Containing 2	3.17	3.21	0.05
PLSCR1	Phospholipid Scramblase 1	3.39	2.53	0.01
PPP3CA	Protein Phosphatase 3. Catalytic Subunit. Alpha Isozyme	4.22	3.56	0.01
PRKX	Protein Kinase. X-Linked	3.96	3.12	0.05
PROS1	Protein S (Alpha)	7.39	13.92	0.04
PSMA1	Proteasome (Prosome. Macropain) Subunit. Alpha Type. 1	1.96	0.86	0.02
PSMA2	Proteasome (Prosome. Macropain) Subunit. Alpha Type. 2	3.66	4.23	0.05
PTPRC	Protein Tyrosine Phosphatase. Receptor Type. C (CD45)	2.31	1.94	0.05
PTPRO	Protein Tyrosine Phosphatase. Receptor Type. O	11.59	19.27	0.01
RAB27A	RAB27A. Member RAS Oncogene Family	9.99	22.73	0.04
ROCK2	Rho-Associated. Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2	1.98	1.13	0.02
RORA	RAR-Related Orphan Receptor A	2.98	2.60	0.02
SEC23A	Sec23 Homolog A (S. Cerevisiae)	2.93	1.87	0.02
SERPINA3	Serpin Peptidase Inhibitor. Clade A	2.12	1.55	0.04
SERPING1	Serpin peptidase inhibitor. clade G (C1 inhibitor). member 1	2.35	1.07	0.01
SH3GL2	SH3-Domain GRB2-Like 2. Endophilin 1	2.81	2.11	0.02
SIN3A	SIN3 Transcription Regulator Homolog A	2.24	1.58	0.04
	Solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain. Xc-system) member 11	38.45	7	0.01
SLC7A11				
SLC7A2	Solute carrier family 7 member 2	12.11	14.99	0.01
SMAD1	SMAD Family Member 1	29.43	69.56	0.02
SMAD5	SMAD Family Member 5	1.88	0.71	0.04
SOCS3	Suppressor Of Cytokine Signaling 3	1.85	0.96	0.02
SOD2	Superoxide Dismutase 2. Mitochondrial	4.66	3.83	0.02
SOS1	Son Of Sevenless Homolog 1	1.81	0.81	0.05
SOX6	Transcription Factor SOX-6	6.76	14.10	0.04
SP3	Sp3 Transcription Factor	3.71	3.05	0.01
SRPK2	SRSF Protein Kinase 2	4.07	3.11	0.04
SYNCRIP	Synaptotagmin Binding. Cytoplasmic RNA Interacting Protein	2.12	0.99	0.02
TAB2	TGF β -Beta Activated Kinase 1/MAP3K7 Binding Protein 2	1.90	1.08	0.01
TGFB1	Transforming growth factor. beta-induced	4.29	6.92	0.02
TGFBR3	Transforming growth factor. beta receptor III	7.10	9.29	0.02
TIPARP	TCDD-Inducible Poly(ADP-Ribose) Polymerase	3.25	3.27	0.05
TLR5	Toll-like receptor 5	3.53	5.56	0.05
TLR7	Toll-like receptor 7	1.73	1.36	0.02
TMEM176B	Transmembrane Protein 176B	1.50	0.44	0.04
TNFSF13	Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily. Member 13	1.74	1.20	0.05

TRIL	TLR4 Interactor With Leucine Rich Repeats	2.78	2.07	0.02
TWSG1	Twisted Gastrulation Protein Homolog 1	1.84	1.16	0.02
TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein	2.20	1.28	0.01
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	3.38	2.84	0.02
WASL	Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein	2.59	3.55	0.04
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1	1.55	0.59	0.04
ZFP36L1	ZFP36 Ring Finger Protein-Like 1	1.87	0.56	0.02
ZNF175	Zinc Finger Protein 175	4.53	5.46	0.01
Down-regulated				
ARIH2	Ariadne Homolog 2 (Drosophila)	0.68	0.34	0.05
ATP1B1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ Transporting, Beta 1 Polypeptide	0.67	0.28	0.04
ATP6V1H	ATPase, H ⁺ Transporting, Lysosomal 50/57kDa, V1 Subunit H	0.42	0.26	0.01
CDC42	Cell Division Cycle 42	0.75	0.35	0.04
CHST2	Carbohydrate (N-Acetylglucosamine-6-O) Sulfotransferase 2	0.65	0.45	0.05
CLTA	Clathrin, Light Chain A	0.67	0.18	0.02
CXADR	Coxsackie Virus And Adenovirus Receptor	0.39	0.33	0.01
ERBB3	V-Erb-B2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 3 (Avian)	0.65	0.28	0.02
FKBP1A	Immunophilin FKBP12	0.63	0.28	0.01
GAB1	GRB2-Associated Binding Protein 1	0.75	0.31	0.04
GNL1	Guanine Nucleotide Binding Protein-Like 1	0.53	0.45	0.02
HRAS	V-Ha-Ras Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog	0.53	0.25	0.01
JAM3	Junctional Adhesion Molecule 3	0.67	0.16	0.01
MGLL	Monoglyceride Lipase	0.73	0.35	0.05
OSBPL1A	Oxysterol Binding Protein-Like 1A	0.73	0.26	0.04
OTUD7B	Cellular Zinc Finger Anti-NF-Kappa-B Protein	0.63	0.14	0.01
PFDN1	Prefoldin Subunit 1	0.69	0.20	0.02
PIP4K2A	Phosphatidylinositol-5-Phosphate 4-Kinase, Type II, Alpha	0.64	0.21	0.02
PTPN1	Protein Tyrosine Phosphatase, Non-Receptor Type 1	0.72	0.21	0.02
PTPRO	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, O	0.72	0.30	0.04
PXK	PX Domain Containing Serine/Threonine Kinase	0.58	0.30	0.02
RPS6KA2	MAP Kinase-Activated Protein Kinase 1c	0.71	0.20	0.02
S100A13	S100 Calcium Binding Protein A13	0.67	0.24	0.04
S100B	S100 Calcium Binding Protein B	0.69	0.36	0.05
SEC61A2	Sec61 Alpha 2 Subunit (S. Cerevisiae)	0.64	0.34	0.02
SEMA4D	Sema Domain, Immunoglobulin Domain (Ig), Transmembrane Domain (TM) And Short Cytoplasmic Domain, (Semaphorin) 4D	0.57	0.30	0.01
SLC16A3	Solute Carrier Family 16, Member 3 (Monocarboxylic Acid Transporter 4)	0.58	0.36	0.02
SP1	Sp1 Transcription Factor	0.71	0.17	0.02
SP3	Sp3 Transcription Factor	0.42	0.43	0.02
SRPK1	SRSF Protein Kinase 1	0.68	0.36	0.02
SYNCRIP	Synaptotagmin Binding, Cytoplasmic RNA Interacting Protein	0.66	0.31	0.04

Data are presented as mean ratio values obtained from the paired comparisons of gene expression levels in microdissected PDL vs. NAWM regions of 8 MS spinal cords. Among the significantly up or down-regulated genes in PDL vs. NAWM, immune-related genes were identified using GO ontology and a survey of the literature. p-values obtained with the Wilcoxon test are indicated in the right column.

b. Chronic activation of macrophages/microglia

Stainings for CXCR4, the receptor for the chemokine SDF-1, confirmed, at the protein level, the up-regulation observed in PDLs by microarray analyses, and suggested macrophage/microglia recruitment via SDF-1/CXCR4 signaling (Fig. 15). Moreover, the up-regulation of macrophage/microglia activation markers as CD163 and HLA-DRB with the co-expression of anti-inflammatory (IL-27, TGF- β , IL-13) and pro-inflammatory (SCF, APRIL, IFN- γ) signaling suggests an intermediate or mixed activation profile of macrophages/microglia in PDLs. CD163 and TGF β R3 stainings confirmed the observed up-regulation of their corresponding mRNA species (Fig. 15). Along with our histological demonstration that macrophages/microglia accumulate and

present a poor but detectable phagocytic activity in PDLs, our gene expression results suggest a particular activation status of macrophages/microglia in PDLs.

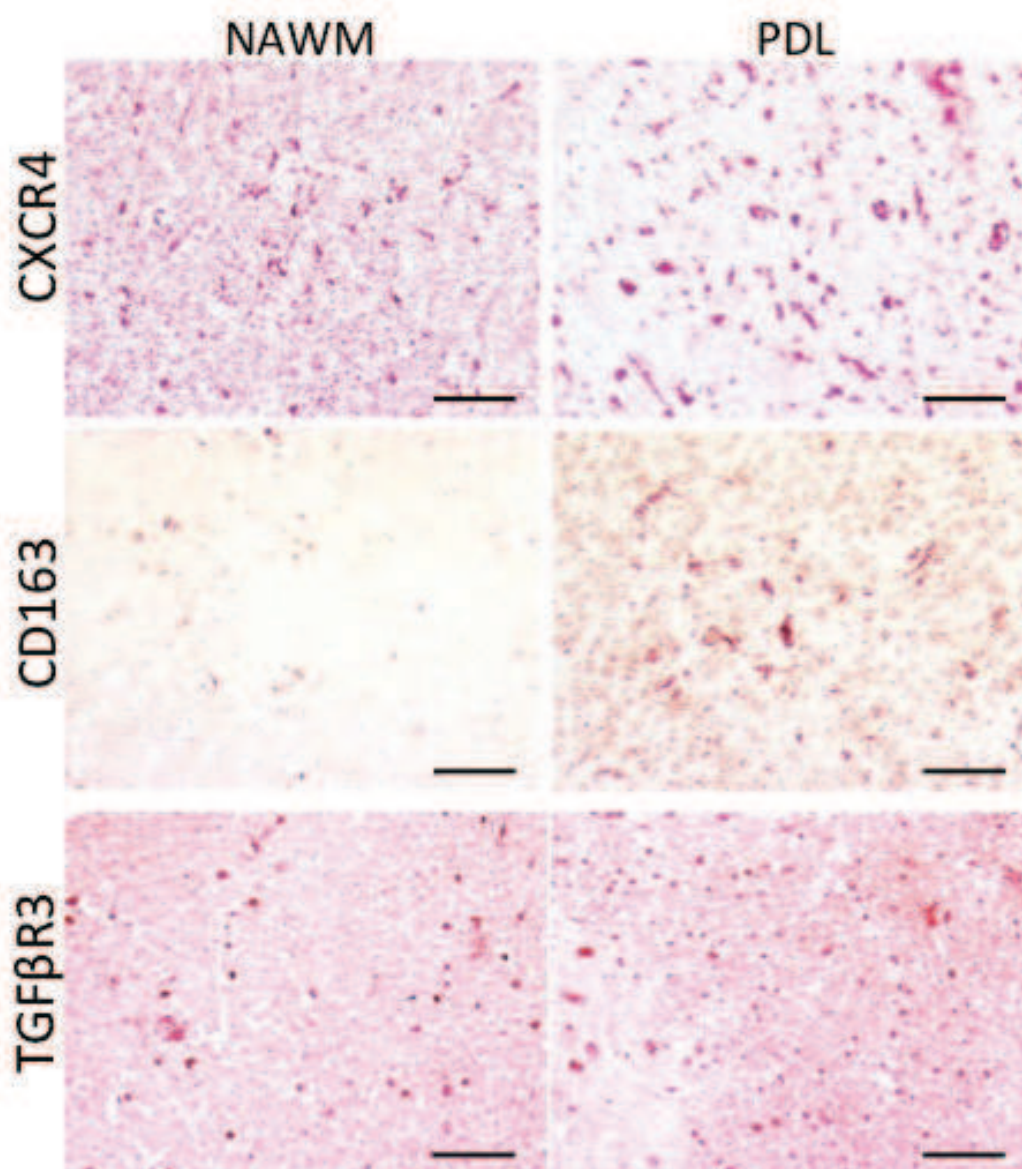


Figure 15: Macrophage/microglia activation profile in PDL of MS spinal cords. Photomicrographs show representative immunostainings of CXCR4, CD163 and TGFβ3 in PDL vs. NAWM regions of spinal cord sections from progressive MS patients (scale bars: 50 μm). A higher density of immunostained cells is observed in PDL as compared to the adjacent NAWM.

b. Abnormal astrocyte molecular signature in PDLs

The analysis of microarray data revealed that a set of astrocyte-related genes was constantly and significantly up-regulated in PDL samples compared to the adjacent NAWM. These genes included notably aquaporin 4 (AQP4), connexin 43 (Cx43) and the glutamate transporter EAAT1 (Table 13). These genes are involved in crucial astrocyte functions important for CNS homeostasis.

Using Western blot and immunohistochemistry, we further demonstrated that protein levels of AQP4, Cx43 and EAAT1 gradually decreased from plaques to PDLs and from PDLs to the NAWM ($p = 0.012$ for AQP4, $p = 0.049$ for Cx43 and $p = 0.055$ for EAAT1, Kruskal-Wallis test; Fig. 16). Interestingly, we did not observe an increased expression of GFAP, at the mRNA or protein level (Fig. 17), indicating that, rather than a classical astrocytosis, subtle astrocyte alterations occur in PDLs.

Table 13: Astrocyte-related genes differentially expressed in PDL vs. NAWM.

Gene symbol	Description	Mean ratio	SD	p-value
Up-regulated				
AQP4*	Aquaporin 4	2.06	1.70	0.01
GJA1*	Connexin 43	3.16	3.77	0.01
SLC7A2	Solute carrier family 7 member 2	12.11	14.99	0.01
CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase 1A	17.21	13.98	0.01
SLC38A1	Solute carrier family 38 member 1	3.51	4.25	0.01
SPARCL1*	SPARC-like 1 (Hevin)	1.66	0.38	0.01
CD44	CD44	1.73	0.77	0.01
NBN*	Nibrin	1.78	0.36	0.01
SLC7A11	Solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, Xc-system) member 11	38.45	100.57	0.01
PRKAG2	AMP-activated protein kinase subunit gamma-2	3.99	5.50	0.01
NTRK3	Tyrosine kinase receptor C (Trk-C)	2.48	1.92	0.02
SLC1A3*	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter) member 3 (GLAST, EAAT1)	1.52	0.48	0.02
AGT	Angiotensinogen	1.71	0.63	0.02
SLC1A2	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter) member 2 (GLT-1, EAAT2)	1.97	1.02	0.02
NTRK2*	TrkB tyrosine kinase	1.98	0.71	0.02
ID4	Inhibitor of DNA binding 4	2.09	1.59	0.04
SERPINE2	Glia-derived nexin	2.10	1.77	0.05
LAMB2	Lamini beta 2	1.64	0.64	0.05
EPHA4	Tyrosine-protein kinase TYRO1	4.71	4.07	0.05
Down-regulated				
S100B	S100 calcium binding protein B	0.69	0.36	0.05
SLC25A13	Solute carrier family 25 (aspartate/glutamate carrier). member 13	0.42	0.29	0.01
SLC17A5	Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter). member 5	0.47	0.27	0.01
SH3BP4	Transferrin receptor-trafficking protein	0.52	0.36	0.02

Data are presented as mean ratio values obtained from the paired comparisons of gene expression levels in microdissected PDL vs. NAWM regions of 8 MS spinal cords. Among the significantly up or down-regulated genes in PDL vs. NAWM, astrocyte-related genes were identified using GO ontology and a survey of the literature. Note that only 4 astrocyte-related genes were identified among down-regulated genes. SD: standard deviation. *: genes showing significant up-regulation in 2 concurrent methods of analysis (Significant Analysis of Microarray method and Wilcoxon signed rank test). p-values obtained with the Wilcoxon test are indicated in the right column.

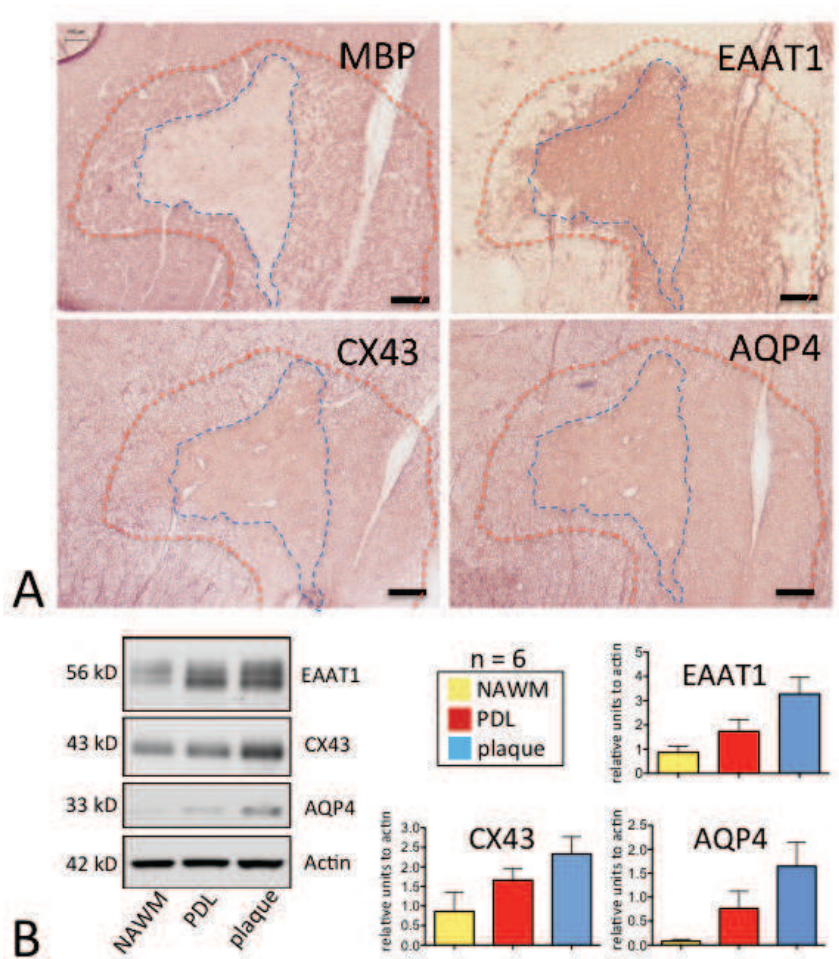


Figure 16: Astrocyte activation in PDL of MS spinal cords. A. Photomicrographs show MBP, EAAT1, CX43 and AQP4 immunostainings that were performed on adjacent spinal cord sections from the same MS tissue sample. Staining intensities of CX43, AQP4 and especially EAAT1 are more pronounced in PDL (red dashed line) as compared to the NAWM. Up-regulation is even more pronounced when comparing in plaque (blue dashed line) to the NAWM (scale bars: 200 μ m). Data shown are representative of stainings obtained from 3 MS spinal cord samples. C. Representative images of western blot analyses of EAAT1, CX43 and AQP4 expression in plaque, PDL or NAWM tissue samples from the same patient. Graphs indicate quantification of western blots using actin or GAPDH as loading control (ratio to actin or GAPDH) on 6 SPMS patients. Statistical analysis with the Kruskal-Wallis test shows a significant differential expression for EAAT1 (p-value = 0.055), Cx43 (p-value = 0.049) and AQP4 (p-value = 0.012) between plaque, periplaque and NAWM regions.

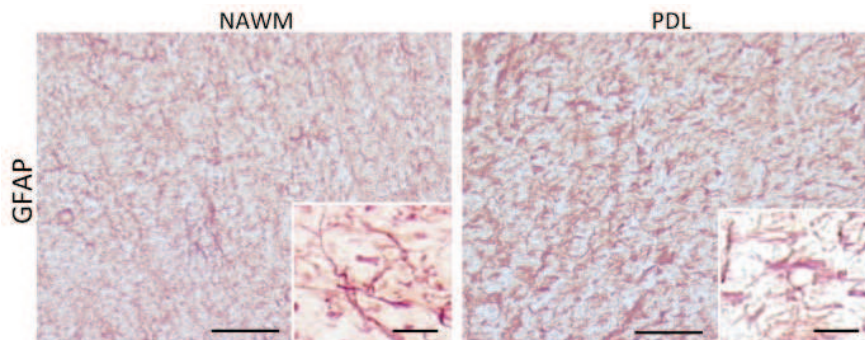


Figure 17: Photomicrographs of a GFAP-stained spinal cord section from a progressive MS patient are shown in NAWM and PDL (scale bars: 50 μ m). Higher magnification views are shown in insert (scale bars: 5 μ m). At the mRNA level, our microarray analysis showed that GFAP is not differentially expressed in PDL vs. NAWM (ratio PDL/NAWM = 2.11 \pm 1.16, p = 0.07).

8) Discussion

Our work shows that in the spinal cord of PPMS and SPMS patients, PDLs represent a unique compartment where a specific process of tissue remodelling takes place. We propose that in PDL, subtle alterations of astrocyte functions are accompanied by low-grade inflammatory events that lead to a progressive loss of myelin and a failure of remyelination. Areas of incomplete demyelination were previously demonstrated in the periplaques of MS brains or spinal cords (Nijeholt *et al.* 2001; Zhang *et al.* 2013a) and were found to translate into a gradual heterogeneity of MRI texture in post-mortem studies (Zhang *et al.* 2013a). In the present study, MBP immunostaining of spinal cord sections showed that PDLs covered unexpectedly large areas relative to the fully demyelinated plaques or to the whole spinal cord surface. Because the spinal cord contains anatomical tracts of major motor and sensory importance, this observation indicates that spinal cord PDLs are likely to have a significant impact on the neurological status of SPMS and PPMS patients. Supporting this view, a previous study provided evidence that neurological disability in patients with progressive MS correlated with the extent of demyelination in the spinal cord but not in the brain (Bramow *et al.* 2010). In the present work, we could also demonstrate at the gene and protein level that myelin loss predominated over axonal loss and was not accompanied by significant remyelination in spinal cord PDLs. Indeed, expression of key genes for mature or immature oligodendrocytes was decreased in PDLs and no morphological signs of remyelination could be observed. In addition, the expression of CD44, an inhibitor of remyelination in chronic MS lesions (Back *et al.* 2005; Chang *et al.* 2012), was up-regulated in PDLs.

Our data also indicates that a chronic, slowly-progressive inflammatory and demyelinating process takes place in PDLs. Thus, the accumulation of macrophages/microglia correlated with myelin but not axonal loss and phagocytosis of myelin debris, although rare, was readily demonstrated in PDLs. At the molecular level, inflammation in PDLs was characterized by the concomitant expression of pro- and anti-inflammatory signatures, which indicates a chronic rather than acute inflammatory process. In particular, we found that both the TGF- β and the IFN- γ pathways were engaged in PDLs and that up-regulated cytokines comprised the pro-inflammatory B-cell growth and differentiation factor APRIL as well as the anti-inflammatory molecule IL-27 (Vincent *et al.* 2013; Hirase *et al.* 2013). Similarly, we observed at the mRNA and protein levels an up-regulation of both CD163, a prototypic anti-inflammatory M2-type macrophage marker (Mantovani *et al.* 2004) and CXCR4, a chemokine receptor playing a major role in macrophages/microglia recruitment and activation (Tanabe *et al.* 1997; Li & Ransohoff 2008; Man *et al.* 2012). The co-existence of pro- and anti-inflammatory molecular signatures was previously reported in the NAWM of brains from PPMS or SPMS patients (Zeis *et al.* 2008a). The co-

expression of M1-type pro-inflammatory and M2-type anti-inflammatory markers was also recently demonstrated on macrophages/microglia in chronic MS lesions (Vogel *et al.* 2013; Fischer *et al.* 2013b). Altogether, these studies and ours suggest that chronic inflammation in MS is characterized by a peculiar cytokine milieu that cannot be interpreted on the exclusive basis of pro- vs. anti-inflammatory signals. However, one may argue alternatively that successive cycles of pro- vs. anti-inflammatory processes could translate into a long-lasting state of priming in macrophages/microglia and, possibly, astrocytes.

Finally, the present work provides strong evidence that chronic astrocyte alterations occur in spinal cord PDLs. This is indicated by the increased expression of astrocyte-related molecules that were previously demonstrated in chronic MS plaques. These include in particular the glutamate transporters EAAT1 and EAAT2 (Vallejo-Illarramendi *et al.* 2006; Newcombe *et al.* 2008), the water channel AQP4 (Sinclair *et al.* 2007; Misu *et al.* 2007; Roemer *et al.* 2007), the neurotrophin receptor TrkB (Colombo *et al.* 2012), which was recently suggested to be involved in MS-related neurodegeneration (Colombo *et al.* 2012) and the astrocyte-specific connexin Cx43 (Markoullis *et al.* 2012; Giaume *et al.* 2013). Connexins form gap junctions that connect astrocytes into extensive networks and support crucial astrocyte functions with regard to neuronal metabolism, oligodendrocyte survival and synaptic transmission (Giaume *et al.* 2013). Interestingly, the pattern of connexin expression, we found in PDLs, resembles the pattern recently described in chronic MS plaques (Markoullis *et al.* 2012). Indeed, while Cx43 was increased, Cx47, the main connexin forming gap junctions between astrocytes and oligodendrocytes (Giaume *et al.* 2013), was decreased. These data suggests that in PDL as in chronic MS plaques, an altered expression of connexins may provoke a dysfunction of the astrocyte network and of astrocyte-oligodendrocyte communications via gap junctions. Whether and how such alterations may drive demyelination and/or prevent remyelination remains to be formally established (Altevogt & Paul 2004; Markoullis *et al.* 2012). Besides connexins, the up-regulation of AQP4 and glutamate transporters may be interpreted as a protective mechanism possibly triggered by a disturbed water balance and an increased extra-cellular concentration of glutamate in PDL. On the other hand, immune molecules on their own might induce an up-regulation of AQP4 and glutamate transporters, which, in turn, might lead to local alterations of glutamate and/or water homeostasis. Supporting this view, several *in vitro* studies showed that astrocytes submitted to pro-inflammatory signals up-regulate the expression and/or activity of Cx43 (Froger *et al.* 2010; Bennett *et al.* 2012), AQP4 (Ito *et al.* 2006; Asai *et al.* 2013) and EAAT2 (Tilleux *et al.* 2009). It has also to be underscored that a dysregulation of non-immune functions in astrocytes or astrocyte networks may drive immune alterations in macrophages/microglia (Farina *et al.* 2007).

Low-grade active demyelination in periplaque white matter was previously demonstrated in the brain of SPMS patients (Prineas *et al.* 2001). Similarly, PDLs in the spinal cord of PPMS or SPMS patients could represent the slow and extensive expansion of demyelinated lesions that occurs in the absence of acute inflammation. Our work presents possible astrocyte-mediated molecular mechanisms for this expansion.

**II. Les programmes d'activation macrophagique/
microgliale dans les pathologies à composantes neuro-
inflammatoires et neuro-dégénératives : identification
de signatures communes vs. spécifiques par une
approche *in silico***

A/ Contexte du travail

Notre première étude a permis d'identifier des gènes sur-exprimés ou sous-exprimés dans les LDP en prenant comme référence la SBAN. Dans notre analyse des données générées par les puces à ADN, nous avons choisi de catégoriser les gènes par type cellulaire, notamment les gènes associés aux oligodendrocytes, aux astrocytes ou aux macrophages et cellules microgliales, considérant qu'un gène est exprimé principalement par un type cellulaire. Néanmoins, dans ce type d'étude, l'identification des gènes différentiellement exprimés n'est pas réellement spécifique de chaque type cellulaire. En effet, elle ne tient pas compte de la variation de fréquences de chaque type cellulaire entre deux échantillons. De plus, pour le cas des gènes immunitaires, il n'est pas vraiment réaliste de distinguer ceux associés aux cellules microgliales uniquement, aux lymphocytes... sachant que l'on découvre de plus en plus de fonctions immunes associées aux astrocytes et aux neurones. Notre quête de mieux caractériser la **réponse macrophagique/microgliale dans les formes progressives de la SEP** ne pouvait donc pas s'arrêter là. Si notre étude a permis d'identifier un environnement immunitaire et une réponse macrophagique/microgliale spécifique des LDP, nous ne pouvons pas affirmer que les mécanismes moléculaires mis en évidence sont exclusifs aux macrophages/cellules microgliales.

Les techniques pour pallier ce problème, par exemple le tri cellulaire ou la microdissection de cellules uniques, sont coûteuses et ne sont pas facilement réalisables, en particulier pour des tissus humains dont on dispose d'échantillons de petites tailles et pour des cellules très ramifiées formant des réseaux comme les astrocytes et les cellules microgliales. Alors, pour ne pas laisser sans suite les analyses de puces sur tissus humains et identifier proprement des profils d'activation macrophagique/microgliale, nous avons mis au point une **technique de microdissection virtuelle des données transcriptomiques**, simple et rapide à mettre en place pour des biologistes.

Les techniques de microdissection virtuelle actuellement disponibles sont basées, soit sur le principe de déconvolution (Abbas *et al.* 2009; Shen-orr *et al.* 2010; Zhao & Simon 2010), soit sur des méthodes de regroupement ou « clustering » en anglais (Tavazoie & Church 1998; Eisen *et al.* 1998; Ross *et al.* 2000; Shaffer *et al.* 2001; Almstrup *et al.* 2004; Kuhn *et al.* 2011). La première solution consiste, à l'aide d'une approche probabiliste, à quantifier l'abondance relative de chaque type cellulaire et de comparer les profils d'expression moyens de chaque type cellulaire dans deux échantillons. Cependant, dans un contexte inflammatoire et de mort cellulaire, certains types cellulaires s'accumulent et d'autres disparaissent, il est donc difficile de tenir compte de la variabilité des échantillons. Nous avons donc préféré mettre au point une **méthode de regroupement supervisé permettant d'organiser des données transcriptomiques autour d'un**

gène de référence spécifique d'un type cellulaire, notamment *Iba-1* pour les macrophages/cellules microgliales (Eisen *et al.* 1998; Butte 2002).

Revenons maintenant au cœur du sujet: **l'activation macrophagique/microgliale dans la SEP est-elle différente de celles des autres pathologies du SNC?** Qui oserait aujourd'hui contester l'implication de la réponse inflammatoire dans les désordres neurologiques ? Si elle est évidente dans la SEP, la maladie neuro-inflammatoire par excellence, elle semble s'imposer également pour les pathologies neurodégénératives comme la maladie de Parkinson ou la maladie d'Alzheimer (Amor *et al.* 2013). Une attention particulière s'est portée sur l'activation macrophagique/microgliale en présence de neurodégénérescence, faisant émerger une littérature impressionnante sur le sujet dans les vingt dernières années. Cependant, la diversité des mécanismes moléculaires et la spécificité par maladie de cette réponse immunitaire sont encore mal comprises. Si des mécanismes non-autonomes de mort cellulaire sont maintenant bien acceptés pour expliquer la mort neuronale, du moins en partie (Boillée *et al.* 2006), les fonctions des macrophages/cellules microgliales restent ambiguës puisque des activités neuro-toxiques mais aussi neuro-protectrices ont été décrites en fonction du site lésionnel et de l'avancée de la maladie. Y compris en conditions physiologiques, les cellules microgliales façonnent l'environnement immunitaire des neurones visant à éviter à toutes perturbations de s'installer. Etablissant un dialogue continu avec les neurones, on les considère donc comme de véritables senseurs de l'activité du cerveau. Lorsqu'elles sont activées, les cellules microgliales sont difficilement distinguables des macrophages infiltrant. Mais l'on se pose toujours la question de savoir si la nomenclature utilisée actuellement pour les macrophages peut réellement l'être pour les cellules microgliales. Habituellement, deux phénotypes décrivent les macrophages : le **type M1**, dit « activé classiquement », pour sa nature pro-inflammatoire, ou le **type M2**, dit « activé autrement », pour sa nature anti-inflammatoire (Allavena & Mantovani 2012). Est-ce que les cellules microgliales sont en adéquation avec les phénotypes M1 ou M2 au cours des désordres neurologiques ? De plus, la nomenclature des macrophages est en train de vivre un tournant, passant d'une désignation restrictive, M1 versus M2, à la reconnaissance d'une véritable plasticité des macrophages et d'un spectre beaucoup plus large de leurs états d'activation, incluant à la fois les macrophages « activés classiquement » mais aussi les « réparateurs », les « éboueurs », les « régulateurs »...(Cunningham 2013).

Dans ce contexte et comme l'ont suggéré d'autres auteurs, nous avons fait l'hypothèse que **les macrophages mettent en jeu un profil d'activation spécifique de chaque pathologie du SNC** (Mantovani *et al.* 2004; Sica & Mantovani 2012). De la même façon, nous supposons qu'un gradient d'activation, allant de l'activation classique M1 à la voie alternative M2 existe pour les cellules microgliales et est spécifique pour chaque maladie (Perry 2010; Saijo & Glass 2011). Nous

avons donc cherché, dans une deuxième étude, à identifier les profils d'activation macrophagique/microgliale humains dans des formes progressives de la SEP et dans cinq autres pathologies du SNC - **la maladie d'Alzheimer, la sclérose latérale amyotrophique (SLA), la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson et la schizophrénie** - en utilisant le jeu de données transcriptomiques décrit ci-dessous et l'approche de microdissection virtuelle évoquée ci-dessus.

Afin de valider notre méthode, nous l'avons testée sur un large jeu de données généré par le réseau européen BrainNet Europe. En effet, les données de puces transcriptomiques sont aujourd'hui mises à disposition dans des bases de données. BrainNet Europe a réalisé une étude comparative de données d'expression de génome entier issues d'une large cohorte de 118 échantillons *post-mortem* de SNC très bien caractérisés. Ces échantillons correspondent aux régions lésées de 63 patients répartis dans six pathologies et aux régions saines équivalentes de 55 sujets contrôles (Table 1). Outre la qualité exceptionnelle de cette cohorte et l'homogénéité du traitement des échantillons, nous avons choisi cette cohorte car elle contient d'une part des échantillons de patients atteints de formes progressives de la SEP, mais aussi des échantillons d'autres pathologies du SNC. Elle nous a donc permis de comparer les résultats obtenus pour **les lésions corticales de la SEP** et de les mettre en perspectives dans des contextes neuro-inflammatoires très différents. Nous présenterons ici principalement les résultats concernant les profils d'activation macrophagique/microgliale sur lesquels se consacre notre second article. Toutefois, il est certain que cette méthode d'analyse peut également être utilisée pour d'autres types cellulaires et ouvrir un nouveau regard sur les données transcriptomiques.

Nous avons organisé ces données d'expression en utilisant *Iba-1* comme gène de référence macrophagique/microglial. En effet, une façon simple d'organiser les données de puces est de regrouper les gènes qui présentent des profils d'expression similaires dans les conditions testées (Tavazoie & Church 1998; Eisen *et al.* 1998; Alizadeh *et al.* 2000; Ross *et al.* 2000; Shaffer *et al.* 2001; Palmer *et al.* 2006). Cette méthode a été développée pour trouver des groupes, ou « clusters », de gènes partageant une fonction commune (Eisen *et al.* 1998) ou un réseau de régulation commun (Tavazoie & Church 1998). La première étape a été de choisir un critère mathématique pouvant décrire la similarité de deux profils d'expression. Nous avons utilisé le coefficient de corrélation standard qui nous semble intuitivement décrire le concept biologique selon lequel deux gènes sont « co-exprimés ». Ceci est probablement dû au fait que ce paramètre statistique s'intéresse à la « forme » des profils d'expression mais ne s'attache pas aux valeurs absolues des deux séries de mesures (Eisen *et al.* 1998). En utilisant *Iba-1* comme gène de référence macrophagique/microglial, nous avons identifié le groupe de gènes corrélés à l'expression d'*Iba-1*. Nous avons considéré que ces gènes sont co-exprimés par les macrophages/cellules microgliales.

En d'autres termes, au sein d'une condition pathologique, tous les gènes pour lesquels les valeurs d'expression varient de la même façon que celles d'*Iba-1* parmi les échantillons du groupe ont été identifiés. Une condition pathologique regroupe les échantillons d'une pathologie et les échantillons contrôles associés, de la même région anatomique. Ainsi, nous augmentons la gamme de variation d'expression d'*Iba-1* et tenons compte de l'effet de la pathologie sur la quantité et l'état d'activation des macrophages/cellules microgliales. Les échantillons issus de patients, analysés par le réseau BrainNet Europe, contenant tous des sites lésionnels, les macrophages/cellules microgliales y sont considérés activés. Nous avons admis que la valeur d'expression d'*Iba-1* reflète la quantité de macrophages/cellules microgliales activés au sein des échantillons de patients et que les gènes qui présentent la même variation que *Iba-1* constituent la signature moléculaire des programmes d'activation macrophagique/microgliale. De cette façon, nous avons pu identifier des **programmes d'activation macrophagique/microgliale communs vs. spécifiques de six pathologies humaines du SNC**.

B/ Résultats principaux du travail

L'extraordinaire qualité du jeu de données transcriptomiques généré par le réseau BrainNet Europe nous a permis :

- 1) **De valider notre approche de microdissection virtuelle** en l'appliquant à 118 échantillons *post-mortem* ayant subi exactement les mêmes traitements, du prélèvement à la normalisation des puces d'expression.
- 2) **D'identifier des signatures communes et spécifiques des activités macrophagiques/microgliales** en fonction de leur micro-environnement, spécifique de chaque pathologie du SNC.
 - Nos observations confirment l'implication de l'activation macrophagique/microgliale dans l'atteinte neuronale et/ou la neuro-dégénérescence. Une **base commune** à cette activation est partagée par la SEP et les autres pathologies étudiées : la maladie d'Alzheimer, la SLA, la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson et la schizophrénie.
 - Les résultats soulignent la **persistance de cette activation dans les conditions neuro-dégénératives chroniques** testées. Le microenvironnement des macrophages/cellules microgliales modèle vraisemblablement leurs propriétés. En retour, ils sont impliqués dans la mise en place d'un **remodelage tissulaire** du SNC qui semble incapable de rétablir les conditions physiologiques initiales.

- Cette contribution est **systematique** et **specifique** de chaque désordre neurologique. En effet, nos résultats ont révélé des signatures d'activation macrophagique/microgliale spécifiques de chaque pathologie. En particulier, nous pouvons mentionner l'*Ostéopontine*, le *récepteur Folate 2* et le *CKLF* pour la SEP ; l'*Angiopoïétine 1* ou le *PSME1* pour la maladie d'Alzheimer ; la *Granuline* ou la *Cathepsine D* pour la SLA ; le *facteur de biogénèse peroxisomale 13*, *CD300A* et *BAFF* pour la maladie de Parkinson ; *STAT1* et *PSME4* pour la maladie de Huntington et l'Adiponectine, *IL-1 β* , *IL-10RA* et *TGF- β* pour la schizophrénie.
- Ces résultats démontrent la **grande plasticité moléculaire des macrophages/cellules microgliales** et leur finesse d'adaptation aux changements de leur microenvironnement. Ils pourraient aider au développement de futures marqueurs diagnostiques/pronostiques et/ou de stratégies thérapeutiques plus spécifiques pour cibler les fonctions macrophagiques/microgliales.

Notre étude ouvre plusieurs portes. Notamment, une question reste en suspens. Existe-t-il une signature précoce de ces programmes d'activation macrophagique/microgliale dans les précurseurs sanguins des macrophages qui pourrait être utilisée comme biomarqueur d'une maladie ? De plus, l'approche *in silico* utilisée a également généré de nouvelles informations à propos des profils d'expression des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones. Une analyse plus approfondie de ces données mettra en évidence de nouvelles interactions cellules gliales – neurones.

C/ Article 2 et résultats associés

Les résultats présentés ci-dessus font l'objet d'un second article à soumettre dans *Journal of Neuroinflammation*.

Commun vs. disease-specific macrophage/microglia activation programs in human neuroinflammatory and neurodegenerative disorders: identification by an *in silico* analysis

Alice Lieury^{1,2}, Anne Wierinckx^{2,3}, Laurent Pays^{1,2}, Richard Reynolds⁴ and Serge Nataf^{1,2,5§}

¹INSERM U1028; CNRS UMR 5292; Lyon Neuroscience Research Center, Neuro-Oncology and Neuro-Inflammation team, Lyon, F-69000, France

²University Lyon 1, Lyon, F-69000, France

³ProfileXpert, Lyon, France

⁴Wolfson Neuroscience Laboratories, Hammersmith Hospital Campus, Imperial College Faculty of Medicine, London, UK

⁵Banque de Cellules et de Tissus, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon (Lyon University Hospital), Lyon, France

Acknowledgements

This work was performed in collaboration with the genomic facility ProfileXpert-LCMT from the University of Lyon. We would like to thank the BrainNet Europe network for their precious data.

1) Context of the work

Involvement of inflammation in central nervous system (CNS) disorders is now well recognized, not only in multiple sclerosis, the prototypical neuroinflammatory disorder, but also in neurodegenerative diseases such as Parkinson's disease or Alzheimer's disease as well as in several psychiatric conditions (Amor *et al.* 2013). Especially, a large literature has been published in the two last decades on macrophage/microglial activation under neurodegenerative conditions. Yet, in the human, the molecular profile and disease specificities of this innate immune response remain uncertain. That neuronal cell death originates, at least in part, from inflammatory non-cell autonomous mechanisms has been clearly demonstrated (Boillée *et al.* 2006). However, under pathological conditions, either neuroprotective or neurotoxic functions have been assigned to macrophages/microglia, mainly depending on the nature of CNS lesions, their localization and the disease stage considered. Moreover, another level of complexity relates to the emerging role of microglia as genuine sensors of neuronal integrity and functions allowing, to some extent, the preservation of CNS homeostasis under physiological conditions (Nikolakopoulou *et al.* 2013; Ueno *et al.* 2013). Finally, while activated microglia recapitulate many phenotypical and functional features of activated macrophages, uncertainties remain regarding the nature of microglial activation programs and their putative resemblance to macrophage activation programs. Indeed, in macrophages, such activation programs were initially reported to fall into two main categories: i) pro-inflammatory M1 activation program and ii) anti-inflammatory M2 activation program (Allavena & Mantovani 2012). In recent years, such a bimodal nomenclature was enriched by the demonstration of a dynamic spectrum of activation programs that translate into a variety of macrophage phenotypes ranging from the classically activated M1 phenotype to diverse wound-healing and/or regulatory M2 phenotypes (Cunningham 2013). Thus, it is now considered that a wide variety of activation programs allow macrophages to finely adapt to each pathological condition in a disease-specific manner (Mantovani *et al.* 2004; Sica & Mantovani 2012). According to the same paradigm, it has been suggested but not yet formally proven that microglial activation programs are disease-specific (Perry 2010; Saijo & Glass 2011). In this context, the present study aimed to identify human macrophage/microglia activation profiles in distinct human CNS pathologies. Since no reliable method permits the isolation of macrophages/microglia from *post-mortem* human CNS tissue, we used an *in silico* virtual microdissection approach that we applied to the analysis of a large set of microarray data generated by the BrainNet Europe network. This set of primary data was obtained from the analysis of 118 CNS tissue samples derived from 55 controls and 63 patients affected by any of the six following disorders and matched for anatomical regions:

Alzheimer's disease (AD), amyotrophic lateral sclerosis (ALS), Huntington's disease (HD), multiple sclerosis (MS), Parkinson's disease (PD) and schizophrenia (SCZ).

Available virtual microdissection techniques are based on either the deconvolution principle (Abbas *et al.* 2009; Shen-orr *et al.* 2010; Zhao & Simon 2010) or on clustering methods (Tavazoie & Church 1998; Eisen *et al.* 1998; Ross *et al.* 2000; Shaffer *et al.* 2001; Almstrup *et al.* 2004; Kuhn *et al.* 2011). The deconvolution method requires the relative amount of each cell type to be determined in each sample analyzed, a parameter that cannot be accurately established from whole CNS tissue. Therefore, we opted for a supervised clustering method (Eisen *et al.* 1998; Butte 2002), using *Iba-1* as macrophage/microglial reference gene. Indeed, a natural basis to organise expression data is to group together genes with similar patterns of expression (Tavazoie & Church 1998; Eisen *et al.* 1998; Alizadeh *et al.* 2000; Ross *et al.* 2000; Shaffer *et al.* 2001; Palmer *et al.* 2006). Such a method was developed to identify clusters of genes sharing a common function (Eisen *et al.* 1998) or a common regulation network (Tavazoie & Church 1998). The first step to this end is to adopt a mathematical description of similarity. We used the standard correlation coefficient that conforms well to the intuitive biological notion of what it means for two genes to be “co-expressed”. This statistical parameter captures similarity in “shape” but does not place emphasis on the magnitude of the two series of measurements (Eisen *et al.* 1998). On this basis, we chose *Iba-1* expression values as a quantitative marker of macrophage/microglia number and identified in each pathological condition the lists of genes harboring the same variations than *Iba-1* across samples. One pathological condition groups together lesional samples and associated control samples from the same anatomical region. This increases the variability of *Iba-1* expression values and considers the effect of the pathology on the amount of and the activation state of macrophages/microglia. These clusters of *Iba-1*-co-expressed genes represent a molecular signature of macrophage/microglia activation programs in each pathological condition. Moreover, comparisons of these lists allowed the identification of common *vs.* disease-specific macrophage/microglia activation programs in six human CNS pathologies.

2) Main results of the work

The extraordinary quality of the transcriptomic data set generated by the BrainNet Europe network gave us the opportunity to:

- 1) **Validate our virtual microdissection approach** using it on 118 *post-mortem* samples exactly treated by the same way, from the sampling to the normalization of microarray values.
- 2) **Identify common *vs.* disease-specific signatures of macrophage/microglia activities** in relation with their micro-environnement specific to each CNS disorder:

- Our observations confirm the true involvement of macrophage/microglia activation in neuronal injuries or neurodegeneration. MS and the five other diseases share a common basis to this activation. A **shared inflammatory denominator** including notably *NOX-2* was unraveled, indicating that several key molecules are involved in distinct macrophage/microglia activation programs across human CNS conditions.
- These data reinforce the concept that **macrophages/microglia are chronically activated in a wide range of neurodegenerative conditions**. The microenvironment seems to shape macrophage/microglia properties. Respectively, they participate in a disease-specific manner to **tissue remodelling** of the CNS that is able to restore initial physiological conditions.
- This contribution is **systematic** and **specific** to each neurologic disorder. Indeed, our results revealed disease-specific macrophage/microglia immune molecular patterns. In particular, mention should be made of *Osteopontin*, *Folate receptor 2* and *Chemokine-like factor CKLF* for MS, *Angiopoietin 1* and *PSME1* for AD, *Granulin* and *Cathepsin D* for ALS, *Peroxisomal biogenesis factor 13*, *CD300A* and *B-cell activating factor (BAFF)* for PD, *STAT1* and *PSME4* for HD and Adiponectin, *IL1 β* , *IL10RA* and *TGFBI* for SCZ.
- These results underscore the **high molecular plasticity of macrophages/microglia** and their finely tuned adaptation in response to microenvironmental cues. Our results may help for the design of future diagnostic/prognostic markers and/or the development of disease-specific macrophage/microglia-targeted therapeutic strategies.

Our study opens several perspectives. Notably, a remaining question is whether an early signature of macrophage/microglia activation programmes exists in macrophagic precursors or not and that could be used as disease biomarkers. Finally, our approach may be successfully applied to astrocytes, oligodendrocytes or neurons and could give the unique opportunity to dissect glia-neuron molecular interactions under specific pathological contexts.

3) Material and methods

Collection of data: A mining of the genomic data banks GEO and ArrayExpress was performed to identify studies responding to the following criteria: i) microarray analysis from dissected snap-frozen tissue, ii) comparison on the same microarray platform of distinct groups of human CNS tissue samples obtained under distinct pathological conditions, iii) normalized data available, iv) number of samples superior to 15 for each pathological condition analyzed. We found that only one

data set, described in Table 1, fulfilled these selection criteria. This corresponded to a multicenter study performed by the BrainNet Europe network with the goal to provide a large set of data for inter-pathology comparisons between AD, ALS, HD, MS, PD and SCZ.

Table 1: Demographic and clinical data

	Samples	Number of patients	Age at death (years)	Disease duration (years)	Post-mortem delay (hours)	Number of controls	Age at death (years)	Post-mortem delay (hours)
Multiple Sclerosis (MS)	Subpial grey matter lesions from the frontal gyri	10	49.4±4.1	22.3±4.5	19±5.5	10	53.1±3.3	13.6±6.3
Amyotrophic lateral sclerosis (ALS)	Cervical spinal cord	10	68.2±6.2	1.9±0.2	27.7±4.6	10	66.8±15.0	12.9±9.3
Parkinson disease (PD)	Substantia nigra	12	81.5±3.0	14.9±3.6	12.7±5.5	8	64.5±10.2	26.2±8.1
Alzheimer disease (AD)	Entorhinal cortex	11	81.3±4.1	NA	6.1±3.2	7	56.5±11.8	8.1±1.3
Huntington's disease (HD)	Ventral head of the caudate nucleus	10	59.1±8.6	20.5±2.0	18.2±10.8	10	53.7±11.1	21.3±4.3
Schizophrenia (SCZ)	Grey matter in Brodmann area 22	10	66.3±9.3	42.2±8.0	22.6±7.2	10	61.2±10.8	18.6±4.0

This table presents the demographic and clinical data related to the *post-mortem* samples from which microarray analyses were performed by the BrainNet Europe network. Data corresponds to the mean ± standard error of the mean (SEM).

In this study, a total of 113 cases were selected retrospectively on the basis of a confirmed clinical and neuropathological diagnosis following a UK prospective donor scheme in accordance with relevant ethics laws (MREC/02/2/39). Following RNA extraction, the whole procedure of labelling and hybridization was carried out by Pr Richard Reynolds' team (Imperial College, Faculty of Medicine, London, UK) in a single experiment, using an Illumina microarray platform (Illumina whole genome HumanRef8 v2 BeadChip, Illumina, London, UK). Briefly, the BeadChips were scanned using the Illumina BeadArray Reader according to standard Illumina scan protocol and the data were extracted using BeadStudio 3.2 (Illumina). Data normalisation were conducted using the Rosetta error models available in the Rosetta Resolver® system (Rosetta Biosoftware, Seattle, Wa, USA) giving a detection p-value. A total of 120 microarray datasets was generated that included 6 technical replicates to assess reproducibility. Only 2 samples showed a very low signal expression, most likely due to abnormal hybridization, that did not pass the quality control test. One of these 2 samples was a technical replicate, therefore there was loss of only 1 case bringing the grand total of cases used to 112. Finally, 118 normalized expression data files were downloaded from ArrayExpress (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>, accession number: E-GEOD-26927) for our *in silico* analysis.

***In silico* identification of *Iba-1* gene co-expression networks:** Microarray data were first filtered according to the expression values of genes in each group of samples analysed. In a given group, only genes considered as expressed (present) in all samples were retained for further analyses. One

gene was considered as being expressed if the normalized expression value was superior to 35 (equivalent to a detection p-value < 0.05). Out of the 20,000 genes assessed in the Illumina platform, we found that, in each pathology, about 11,000 genes were expressed in all the samples of the considered group. Clustering of macrophagic/microglial genes was then performed as follows.

1- Choice of Iba-1 as a macrophage/microglia reference gene. We hypothesized that macrophagic/microglial gene markers could better reflect the number of macrophages/microglia if their expression was stable across macrophage/microglia activation programs. This was possibly the case for *Iba-1*, *CD14*, *CD68*, *CD74*, *DAP12* or *Glut5*. However, *Iba-1* was the sole macrophage/microglial gene marker that was present in all microarray data examined and thus the best suited for a comparison between CNS disorders. Moreover, *Iba-1* is currently used in immunohistochemistry to reveal the presence of macrophages/microglia independently of their activation state. Other macrophage/microglial markers were excluded because of their inconsistent expression in the samples analysed.

2- Identification of genes co-expressed with Iba-1 in each group of samples. For a given group of samples, corresponding to a given pathological condition, the non-parametric Spearman correlation test was used to identify genes whose expression correlated with *Iba-1* expression across samples. One pathological condition groups together lesional samples and associated control samples from the same anatomical region. Thus, this method considers the effect of the pathology on the amount of and the activation state of macrophages/microglia. Moreover, it increases the variability of *Iba-1* expression values across samples limiting the number of false positive correlations. For each pathological condition, the top-100 genes presenting the highest correlation with *Iba-1* were selected for further analysis.

3- Analysis of the lists of top-100 genes correlating with Iba-1 for each pathological condition and validation of the macrophagic/microglial gene clusters. To validate our approach, a gene enrichment analysis was performed on each list of genes using the CTEN (cell type enrichment analysis for microarray data) software (Shoemaker *et al.* 2012). We found that genes expressed by monocytes and myeloid cells were significantly and consistently enriched in the six gene lists examined (Fig. 1). These included notably macrophagic/microglial gene markers such as *CD14*, *CD68*, *CD74*, *DAP12* and *Glut5* (Table 2). Similarly, when performing the gene enrichment analysis based on biological functions using the GeneGo MetaCore™ pathway analysis software from Thomson Reuters (St Joseph, MI), we found that the following macrophagic functions were significantly enriched: phagocytosis, antigen presentation, chemotaxis and complement system among others (Table 3). The functional ontology categories are shown in order of p-values in Table 3. Interestingly, the most significantly enriched categories were all immune-related (Additional table 1). Concurrently, we also used GO ontology to identify genes that, among each gene list,

could be considered as immune-related on the basis of the GO terms “immune system process” and “inflammatory response” (respectively GO:0002376 and GO:0006954). For this purpose, gene lists were analysed with the TargetMine free software (Chen *et al.* 2011). This approach allowed the evaluation of approximately 50% of the genes that were annotated with these two GO terms in each gene list established. As a control, the same analyses were performed on gene lists generated on the basis of co-expression with *Calbindin-2* (*Calb-2*), a neuronal reference gene. Using the CTEN software, we found that these lists of *Calb-2* co-expressed genes corresponded to a molecular signature of neuron-rich structures classified as: whole brain, fetal brain or thalamus (Fig. 1). The analysis with the GeneGo MetaCore software showed that *Calb-2* co-expressed gene lists were highly significantly enriched in genes involved in neuron-related functions such as synaptogenesis, synaptic vesicle exocytosis, axonal guidance and GABAergic neurotransmission. In contrast, enrichment in genes related to immune functions reached significance for only few processes or pathways and only in MS or SCZ samples (Additional table 2).

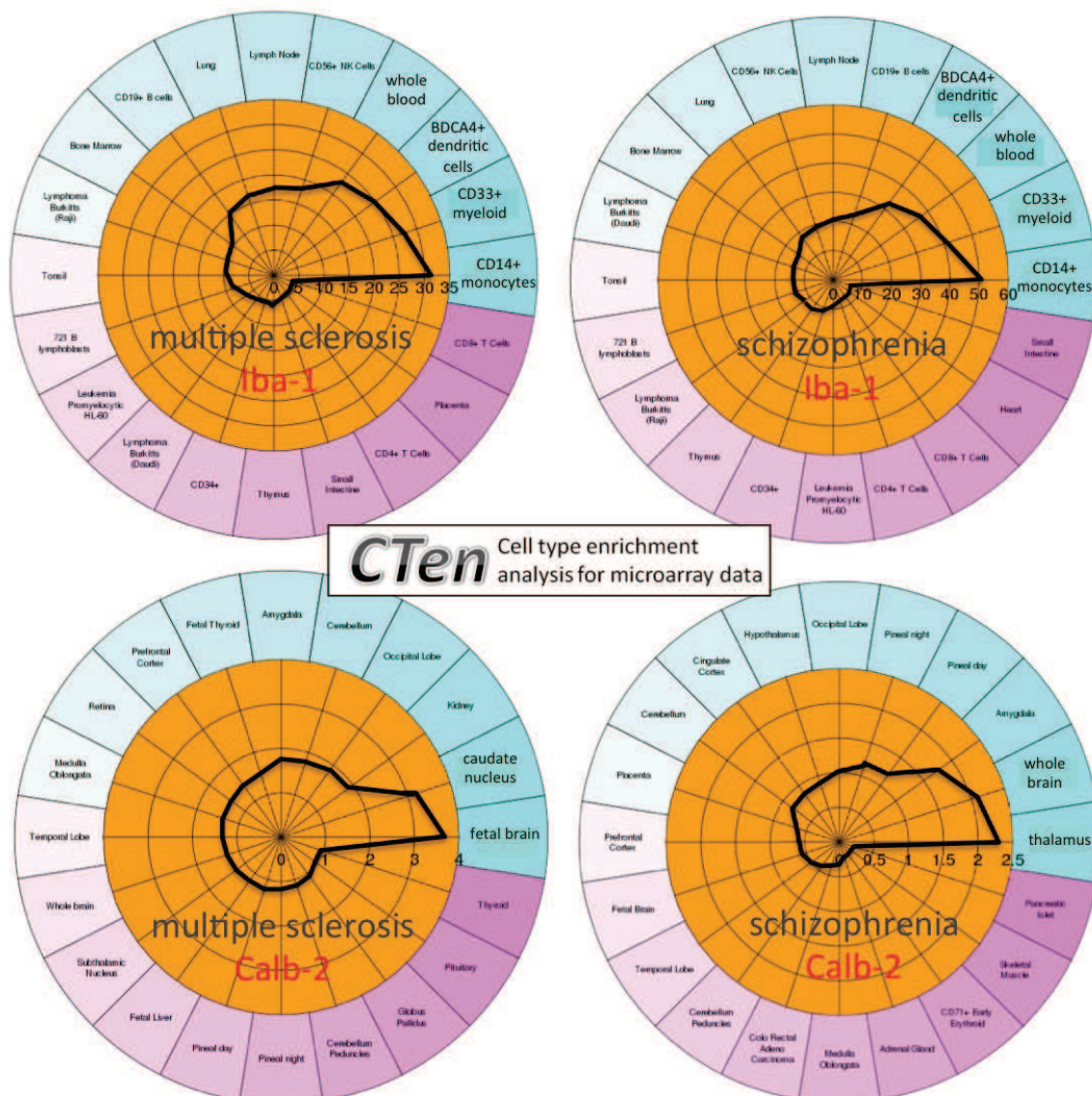


Figure 1: Cell type enrichment analysis of *Iba-1* clusters. The CTen website (cell type enrichment analysis for microarray data; <http://www.influenza-x.org/~jshoemaker/cten/> (Shoemaker *et al.* 2012)) was

used to validate the gene clustering strategy based on *Iba-1* co-expression or *Calb-2* co-expression. Starting from any given list of genes, the CTen website evaluates the enrichment in genes considered as specific from distinct cell types or tissues. Shown are the results provided by the CTen website following the analysis of MS-associated or SCZ-associated profiles obtained by the identification of *Iba-1* or *Calb-2* co-expressed genes. Black lines represent - log₁₀ scores of p-values (Benjamini-Hochberg adjusted p-value) for each cell type or histological structure considered. Scores superior to 2 were considered significant.

Table 2: Identification of distinct disease-associated macrophage/microglia molecular profiles

MS	ALS	PD	AD	HD	SCZ
ADORA3	ARHGDIB	ADORA3	ADORA3	ALOX5	ADORA3
ALOX5	ARPC3	ALOX5	ALOX5AP	ALOX5AP	ALOX5
ALOX5AP	BTK	BTK	ANGPT1	ARHGDIB	ALOX5AP
ARHGDIB	C1QA	C1QA	ARHGDIB	BTK	ARHGDIB
B2M	C1QB	C1QB	B2M	C1QA	BTK
BTK	C1QC	C1QC	BTK	C1QB	C1QA
C1QA	C3	C3	C1QA	CD14	C1QB
C1QB	C3AR1	CASP1	C1QB	CD74	C1QC
C1QC	CARD9	CD14	C1QC	CSF1R	C3
C3	CD14	CD74	C3	CX3CR1	CD14
CD14	CD4	CTSC	C3AR1	CYBB	CD74
CD74	CD74	CX3CR1	CARD9	DOCK2	CD86
CD86	CORO1A	CYBA	CD37	EBI3	CD93
CKLF	CTSD	CYBB	CD74	FYB	CFD
CSF1R	CYBA	EBI3	CD86	HAMP	CSF1R
CTSC	CYBB	FCER1G	CNPY3	HCK	CYBA
CYBA	DOCK2	FYB	CSF1R	HCLS1	FCER1G
CYBB	GPX1	GBP1	CTSC	HCST	FOS
DOCK2	HCST	HCK	CYBA	HLA-DMB	HAMP
EBI3	HLA-DPA1	HCST	CYBB	IFI30	HCK
FCER1G	HLA-DRB4	HLA-DMB	DOCK2	IGSF6	HCLS1
FYB	IKBKE	HLA-DOA	FCER1G	ITGB2	HCST
HAMP	IRF8	HLA-DPA1	FYB	LY86	HLA-DMB
HCK	ITGAL	HLA-DRA	HCLS1	MAFB	HLA-DPA1
HCLS1	ITGB2	IFI30	HCST	MNDA	HLA-DRB4
HCST	LAT2	IL1RAP	HLA-B	NCF4	HMOX1
HLA-DMB	LST1	ILF2	HLA-DMB	NCKAP1L	IER3
HLA-DPA1	LY86	ITGAM	HLA-DPA1	PSME4	IFI16
HLA-DRA	MAPKAPK3	LCP2	HLA-DRA	PYCARD	IGSF6
HLA-DRB4	MNDA	LST1	HLA-DRB4	SASH3	IL1B
HLA-E	MYO1F	LY86	IGSF6	SCIN	IMPDH2
IFI30	NCKAP1L	LYN	IRF8	SERPINA1	INPP5D
IRF1	PIK3CD	MAFB	ITGAM	SLC11A2	IRF8
ITGAM	PLCG2	MR1	ITGB2	SLC7A7	ITGB2
ITGB2	PLEK	NCKAP1L	LCP1	STAT1	LCP1
LY86	PRKCD	PAG1	LST1	TYROBP	LCP2
LY96	PSME2	PIK3AP1	LY86	WAS	LY86
MNDA	PTPN6	PSMA5	LY96		LYN
NCKAP1L	PYCARD	PSMB8	LYN		MAFB
PLCG2	SCIN	PSME2	MNDA		NCF4
PSME2	ST6GAL1	PTPN6	NCKAP1L		NCKAP1L
PYCARD	STXBP2	PTPRE	OLR1		OLR1
RGS1	SYK	PYCARD	PLCG2		PLCG2
RPS6KA1	TREM2	SCIN	PLEK		PLEK
SERPINA1	TRIM21	SEC24D	PSME1		PLSCR1
SLC7A7	TYROBP	ST6GAL1	PTPN6		PYCARD
SPP1	VSIG4	TLR1	PYCARD		SERPINA1
ST6GAL1		TNFSF13B	SCIN		SH2B3
STAB1		TREM2	SERPINA1		SLC7A7
TNFRSF1B		TYROBP	SLC7A7		SPI1
TYROBP		WAS	SPI1		ST6GAL1
VSIG4			ST6GAL1		STAB1
WAS			SYK		STXBP2
			TREM2		TLR5
			TRIM22		VSIG4
			TYROBP		WAS
			WAS		

For each pathology, lists of immune-related genes were identified among the top-100 genes whose expression values correlated with those of *Iba-1* across samples. The complete lists of genes are presented in additional table 3.

Table 3: Gene enrichment analysis of disease-associated macrophage/microglia profiles

	MS	ALS	PD	AD	HD	SCZ
Immune response Phagocytosis	1.8E-09	2E-11	2.6E-11	8.4E-11	0.00021	1.4E-14
Immune response Antigen presentation	2.8E-09	0.0001	0.00000037	9.6E-13	0.000089	0.0003
Inflammation Complement system	5.5E-09	0.000000026	0.00000046	1.7E-10	0.42	5.5E-09
Cell adhesion Leucocyte chemotaxis	0.000014	0.000000058	0.000027	0.0000012	0.00012	0.00000004
Inflammation TREM1 signaling	0.000028	0.00000001	0.014	0.00000027	0.092	0.0011
Inflammation Innate inflammatory response	0.00017	0.0000011	0.0000096	0.0006	0.15	0.00000061
Inflammation Neutrophil activation	0.00065	0.000042	0.000048	0.002	0.0011	0.000026
Inflammation IL-4 signaling	0.0016	0.00011	0.0052	0.00019	0.053	0.00026
Inflammation Histamine signaling	0.0025	0.0045	0.0049	0.0071	0.021	0.00000053
Chemotaxis	0.004	0.0000058	0.011	0.00055	0.0033	0.004
Inflammation IFN-gamma signaling	0.0072	0.000084	1	0.11	0.2	0.0072
Cell adhesion_Integrin-mediated cell-matrix adhesion	0.0092	0.0044	1	0.007	0.21	0.0092
Immune response IL-5 signalling	0.012	0.000059	0.009	0.000088	0.0041	0.0014
Immune response BCR pathway	0.018	0.0000058	0.0021	0.000086	0.27	0.00012
Inflammation IgE signaling	0.018	0.0021	0.00038	0.0032	0.27	0.000019
Cell adhesion Cell-matrix interactions	0.03	1	1	0.19	1	1
Cell adhesion Integrin priming	0.033	0.000084	0.093	0.028	0.2	0.0013
Inflammation NK cell cytotoxicity	0.035	0.00097	0.077	0.0000072	0.12	0.035
Immune response TCR signaling	0.043	0.0065	0.007	0.0022	0.04	0.012
Cell adhesion_Platelet-endothelium-leucocyte interactions	0.044	0.089	0.028	0.0023	0.14	0.044
Inflammation Kallikrein-kinin system	0.054	1	0.0093	0.045	1	0.00095
Immune response T helper cell differentiation	0.071	0.047	0.049	0.061	0.02	0.0046
Cell adhesion Glycoconjugates	0.11	0.005	0.078	0.0075	0.35	0.036
Signal Transduction Cholecystokinin signaling	0.11	0.083	0.085	0.1	1	0.00016
Inflammation Interferon signaling	0.12	0.09	0.093	0.028	0.2	0.033
Cell adhesion Platelet aggregation	0.13	0.00025	0.028	0.00045	1	0.00012
Cell adhesion_Attractive and repulsive receptors	0.13	0.0067	1	0.11	0.37	1
Reproduction_Feeding and Neurohormone signaling	0.2	0.00088	0.15	0.069	0.2	0.00048
Proliferation Lymphocyte proliferation	0.21	0.016	0.15	0.18	0.21	0.084
Cytoskeleton_Macropinocytosis and its regulation	0.24	1	0.2	0.22	0.13	0.014
Inflammation IL-2 signaling	0.32	0.00047	1	0.0075	1	0.11
Proliferation_Negative regulation of cell proliferation	0.33	0.032	0.27	0.13	0.046	0.14
Cytoskeleton_Regulation of cytoskeleton rearrangement	0.33	0.032	1	0.3	0.046	0.052
Inflammation IL-6 signaling	0.38	0.028	1	0.13	1	0.14
Inflammation_IL-10 anti-inflammatory response	1	0.052	1	1	1	0.015
Inflammation Jak-STAT Pathway	1	0.035	0.28	0.047	0.16	0.057
Development_Hemopoiesis,Erythropoietin pathway	1	0.0019	0.15	0.0075	0.27	0.017
Inflammation, MIF signaling	1	0.15	0.012	0.44	0.28	0.00086
Development Blood vessel morphogenesis	1	1	1	0.091	1	0.013

Lists of top-100 genes that correlated with *Iba-1* were analyzed with regard to their level of enrichment in specific GO pathways or processes. The most highly significant enrichments are shown. Depending on the level of statistical significance, p-values are highlighted in dark grey (p<0.001), grey (p<0.01) or light grey (p<0.05) (E-x denotes 10^{-x}). The complete lists of data obtained for each GO term analyzed is presented in additional table 1.

4) Analyses of macrophagic/microglial activation programmes

a. A shared macrophage/microglia activation program across CNS conditions: the common inflammatory denominator

For each group of samples derived from each pathological condition, only the top-100 genes whose expression values showed the most significant correlation with *Iba-1* were further analysed. We first performed controls about the nature of the identified sets of genes. As mentioned in the materials and methods section, in each disease set analyzed, we found that roughly 50% of the genes that co-regulated with *Iba-1* were immune-related (Table 2). A great majority of these exerted innate immune functions that have previously been demonstrated in macrophages/microglia: antigen presentation, phagocytosis, synthesis of cytokines/chemokines, recognition of PAMP (pathogen-associated molecular patterns) or DAMP (damage-associated molecular patterns), signal transduction of cytokine/chemokine receptors and regulation or activation of the complement system (Table 2). Interestingly, whichever the CNS disorder was considered, several immune pathways were significantly enriched in *Iba-1* co-regulated gene lists. These included phagocytosis, antigen presentation and chemotaxis (Fig. 2A). More specifically, we could identify a set of genes that was consistently co-expressed with *Iba-1* across the six CNS conditions (10 genes) or across at least five out of six CNS conditions (26 genes) (Table 4). Based on GO ontology and analysis of the literature, a great majority of these genes are immune-related (21 out of 26) and are notably involved in antigen presentation (*CD74*, *HLA*), the complement system (*C1Q*, *C3*), signal transduction in myeloid cells (*BTK*, *DAP10*, *DAP12*, *WASP*), the formation of the inflammasome (*PYCARD*) or the generation of superoxide ions (*NOX2*). Some of these genes are routinely used as macrophage/microglial gene markers (*CD14*, *CD68*, *Glut5*) and others are not usually considered as primarily exerting immune functions (*APOC2*, *CENTA2*, *ARHGDIB*, *GPR92*, *SI00A11*) (Table 4). Altogether, these data reveal a shared macrophage/microglial molecular profile in CNS disorders, indicating that several key molecules are involved in distinct macrophage/microglia activation programs across human CNS conditions.

Interestingly, among the top-100 genes most correlated with *Iba-1*, 10 genes are always present for the 6 pathologies and 26 are common to at least 5 pathologies (Table 4). This observation cannot be due to hazardous selection. Twenty-one of these 26 are obvious immune-related genes according to their GO ontology and literature (Table 4). The panel of

macrophage/microglia activation, which is enhanced here, oversteps the concept of M1 or M2 activated macrophages. Indeed, both M1 (HLA, NOX2) and M2 (CD14) traditional markers are founded supporting a thin polarization of microglia/macrophages in the samples.

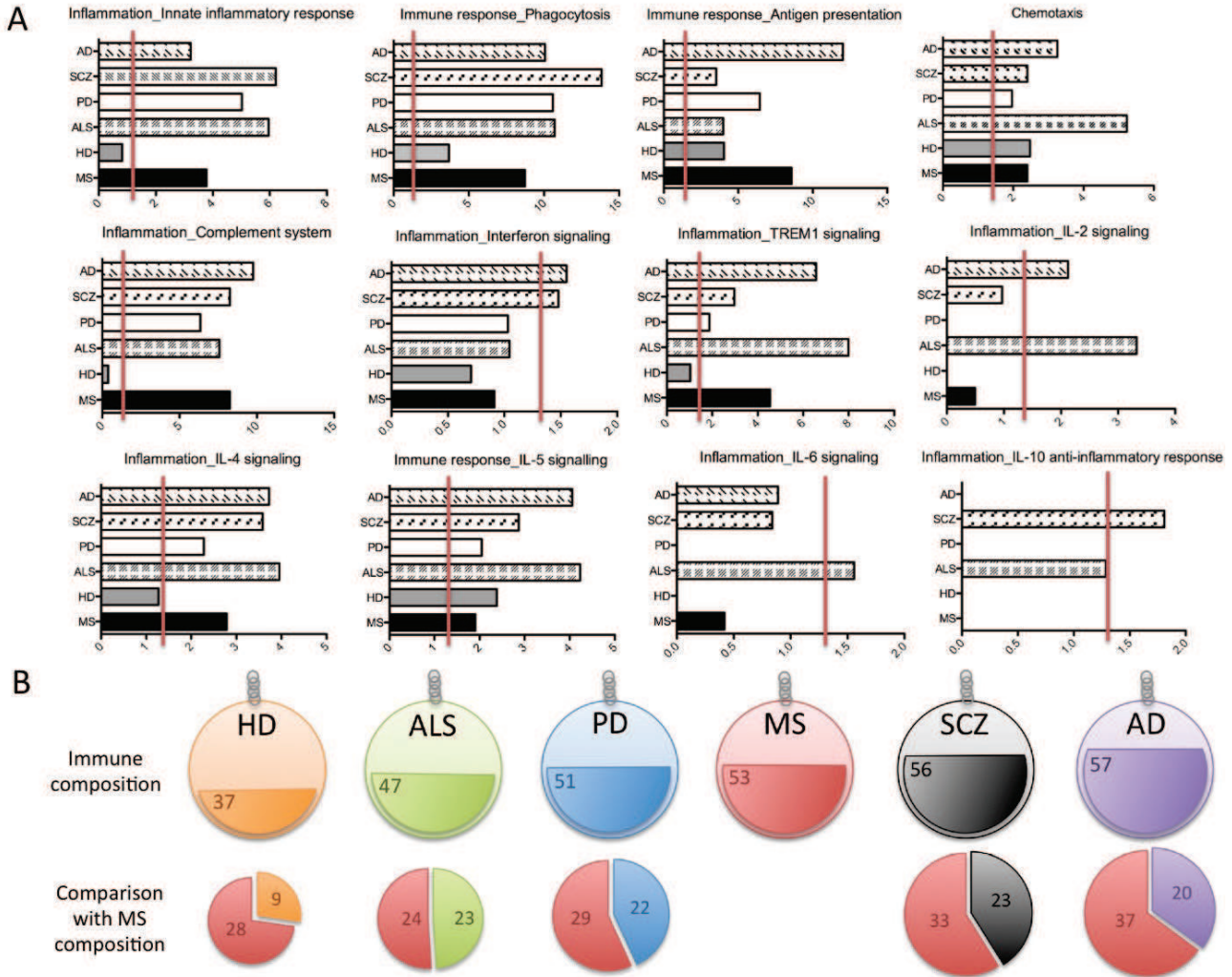


Figure 2: Gene enrichment analysis of *Iba-1* co-expression clusters. **A.** Bars represent the $2 \log_{10}$ transformation of the p-value associated with the level of enrichment of a given GO term in every *Iba-1* cluster. *Iba-1* clusters are formed by the top-100 genes identified as the most significantly correlated with *Iba-1* expression values across samples in a given pathology. The red line represents the chosen cut-off value for statistical significance ($2 \log_{10}$ of $0.05 = 1.3$). **B.** For each disease-associated macrophage/microglia molecular profile (composed of the top-100 genes correlating with *Iba-1* across samples), the amount of immune-related genes is represented in the upper panel (Immune composition). Data show that, as compared to other disease-associated profiles, the HD-molecular profile is less enriched in immune-related genes, which possibly indicates a lower degree of macrophages/microglia activation in HD. In the lower panel, a comparison of immune-related genes shared between MS and other disease-associated profiles is represented. Data show that the AD profile shares the highest number of immune-related genes with the MS profile.

Table 4: Disease-associated macrophage/microglia profiles share a common basis to the 6 pathologies studied

Gene symbol	Description	
APOC2	Apolipoprotein CII	6 diseases
BTK	B cell progenitor kinase	
C1QA	Complement component 1, Q subcomponent, A chain	
C1QB	Complement component 1, Q subcomponent, B chain	
CD74	CD74 molecule, major histocompatibility complex, class II invariant chain	
CENTA2	Centaurin, alpha 2	
HCST	DAP10, hematopoietic cell signal transducer	
LY86	Lymphocyte antigen 86	
NCKAP1L	HEM1, hematopoietic protein 1	
PYCARD	PYD And CARD domain containing	
ARHGDIB	Rho GDP dissociation inhibitor (GDI) beta	5 diseases
C1QC	Complement component 1, Q subcomponent, C chain	
C3	Complement component 3	
CD14	CD14 molecule	
CD68	CD68 molecule	
CYBB	NADPH oxydase NOX2	
CYBA	Cytochrome B-245, alpha polypeptide	
GPR92	Lysophosphatidic acid receptor 5, LPAR5	
HLA-DPA1	Major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1	
HLA-DMB	Major histocompatibility complex, class II, DM beta	
ITGB2	Integrin beta 2, LFA1	
S100A11	Calgizzarin	
SLC2A5	Solute carrier family 2 (facilitated glucose/fructose transporter), member, GLUT-5	
ST6GAL1	B cell antigen CD75	
TYROBP	TYRO protein tyrosine kinase binding protein, DAP12	
WAS	Wiskott-Aldrich syndrome protein	

Lists of disease-associated top-100 genes that correlated with *Iba-1* were compared. Transcripts present in all 6 profiles or in 5 out of 6 profiles were then identified. Only genes that are in bold character are immune-related based on GO ontology and analysis of the literature.

b. Disease-specific macrophage/microglia molecular signatures

Besides the identification of common macrophage/microglia molecular patterns across all diseases analyzed, similarities between macrophage/microglia molecular signatures were identified between specific pathologies, allowing specific innate immune mechanisms to be associated with specific groups of CNS disorders (Fig. 2B). Also, our approach unravelled disease-specific macrophage/microglia immune molecular patterns that are listed in Table 5. Interestingly, literature mining revealed that many of these genes had been previously reported as being involved in the physiopathology and/or genetic susceptibility of the disorder they associated with. Below is a comprehensive presentation of the disease-specific lists of genes that were found to co-regulate with *Iba-1*.

Multiple sclerosis (MS): Microarray analyses were performed on brain cortical grey matter lesions derived from patients with the secondary progressive form of MS, the prototypical inflammatory disease of the CNS. Interestingly, among the twelve MS-specific genes correlated with *Iba-1* (*CKLF*, *CTSZ*, *DOCK11*, *EMILIN2*, *FOLR2*, *HLA-E*, *IRF-1*, *PRSS23*, *RGS1*, *SPPI*,

TNFRSF1B, *TNFSF5IP1*), at least four were previously shown to be involved in MS physiopathology, namely *RGS1*, *HLA-E*, *IRF-1* and *SPP1* (Table 5). Thus, *RGS1* is a locus of MS susceptibility recently identified (Habek *et al.* 2010; Mowry *et al.* 2013), *HLA-E* is abnormally expressed in MS active lesions (Durrenberger *et al.* 2012; Pannemans *et al.* 2013), *IRF-1* intra-CNS expression was shown to be induced by demyelination and oligodendrocyte cell death (Ren *et al.* 2010; Loda & Balabanov 2012) and Osteopontin (*SPP1*) and soluble forms of HLA-E were found to be increased in the plasma and cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients (Vogt *et al.* 2010; Börnsen *et al.* 2011; Morandi *et al.* 2013). Moreover, the expression of *SPP1* was previously demonstrated in macrophages/microglia under inflammatory and demyelinating conditions of the CNS (Chiocchetti *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2008). Finally, it has to be highlighted that three genes coding for secreted factors or their receptors were identified as part of the MS-specific macrophage/microglia molecular signature: the folate receptor *FOLR2*, a receptor previously identified on M2 anti-inflammatory macrophages (Puig-Kröger *et al.* 2009), the type 2 TNF- α receptor (*TNFR2*) *TNFRSF1B* and the myeloid cell chemoattractant *chemokine-like factor* (*CKLF*).

Alzheimer's disease (AD): Microarray analyses were performed on entorhinal cortex samples obtained from patients presenting a confirmed diagnosis of AD, which is characterized by the concomitant presence of Tau protein intraneuronal aggregates, accumulation of amyloid plaques and a robust inflammatory reaction. Among the six AD-specific genes that correlated with *Iba-1* (*ANGPT1*, *CD37*, *DSC2*, *HLA-B*, *PARVG*, *PSME1*), *PSME1*, a gene of the immunoproteasome system, and the pro-angiogenic gene *Angiopoetin-1* (*ANGPT1*) had been previously linked to AD physiopathology. Indeed, in AD brains, the immunoproteasome was found to be activated in microglia (Orre *et al.* 2013) and angiogenesis was shown to accompany amyloid angiopathy (Biron *et al.* 2011; Schreitmüller *et al.* 2012). The relatively low number of genes that identify the AD-specific macrophage/microglia activation program contrasts with the surprisingly high number of genes that are shared between MS and AD signatures (Fig. 2B). Thus, when comparing the number of genes present in both macrophage/microglial profiles, we observed that MS shared the highest number of genes with AD (Fig. 2B). In both MS and AD molecular profiles, the most significant gene enrichment was found for genes involved in the process of antigen presentation (Fig. 2A). Finally, among the profiles identified in the six pathologies studied, the AD profile presented the highest enrichment in genes of the complement system (Fig. 2A), a finding that corroborates previous studies demonstrating deposition of complement components in AD brains (Pasinetti 1996; Stoltzner *et al.* 2000).

Table 5: Identification of disease-specific macrophage/microglia profiles

	Gene symbol	Description
Multiple sclerosis	CKLF	Chemokine-like factor
	CTSZ	Cathepsin Z
	DOCK11	Dedicator of cytokinesis 11
	EMILIN2	Elastin microfibril interfacer 2
	FOLR2	Folate receptor 2
	HLA-E	Major histocompatibility complex, class I, E
	IRF1	Interferon regulatory factor 1
	PRSS23	Serine protease 23
	RGS1	B-cell activation protein BL34
	SPP1	Secreted phosphoprotein 1 (osteopontin, bone sialoprotein I, early T-lymphocyte activation 1)
	TNFRSF1B	Tumor necrosis factor receptor 2
TNFSF5IP1	Proteasome (prosome, macropain) assembly chaperone 2	
Amyotrophic lateral sclerosis	CD4	CD4 molecule
	CORO1A	Coronin, actin binding protein, 1A, phagolysosome
	CTSD	Cathepsin D
	DSE	Dermatan sulfate epimerase
	GRN	Granulin, PC cell-derived growth factor
	IKBKE	Inhibitor of kappa light polypeptide gene enhancer in B-cells, kinase epsilon
	ITGAL	CD11A, lymphocyte function-associated antigen 1 (LFA-1)
	LAIR1	Leukocyte-associated immunoglobulin-like receptor 1
	LAT2	Linker for activation of T cells family, member 2
	MAN2B1	Lysosomal acid alpha-mannosidase; mannosidase, alpha B, lysosomal
	SIPA1	Signal-induced proliferation-associated gene 1
Parkinson's disease	CASP1	Caspase 1, interleukin 1, beta, convertase
	CD300A	CD300a antigen; CMRF35H leukocyte immunoglobulin-like receptor; leukocyte membrane antigen
	GBP1	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible
	HLA-DOA	Major histocompatibility complex, class II, DO alpha
	IL1RAP	Interleukin-1 receptor accessory protein beta
	ILF2	Interleukin enhancer binding factor 2
	MR1	MHC class I-like antigen MR-1
	PAG1	Phosphoprotein associated with glycosphingolipid microdomains 1
	PEX13	Peroxisome biogenesis factor 13
	PLAU	Plasminogen activator, urokinase
	PSMA5	Proteasome (prosome, macropain) subunit, alpha type, 5
	PSMB8	Proteasome (prosome, macropain) subunit, beta type, 8
	SFFV-SPI1	Hematopoietic transcription factor PU.1
TLR1	Toll-like receptor 1	
TNFSF13B	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	
Alzheimer's disease	ANGPT1	Angiopoietin 1
	CD37	Tetraspanin-26
	DSC2	Desmocollin 2
	HLA-B	Major histocompatibility complex, class I, B
	PARVG	Parvin, gamma
	PSME1	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 1
Huntington's disease	CDC20	Cell division cycle 20 homolog
	CDCA5	Cell division cycle associated 5
	CPVL	Carboxypeptidase, vitellogenic-like
	EPB41L3	Erythrocyte membrane protein band 4.1-like 3
	HMHA1	Minor histocompatibility antigen HA-1
	MAF	Avian musculoaponeurotic fibrosarcoma (MAF) protooncogene
	PSME4	Proteasome (prosome, macropain) activator subunit 4
	SLC11A2	Natural resistance-associated macrophage protein 2
STAT1	Signal transducer and activator of transcription 1	
Schizophrenia	CD93	Complement component 1, q subcomponent, receptor 1
	CFD	C3 convertase activator; D component of complement (adipsin); complement factor D
	COTL1	Coactosin-like 1
	FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog
	FPR1	Formyl peptide receptor 1
	IFI16	Interferon, gamma-inducible protein 16
	IL10RA	Interleukin 10 receptor, alpha; CD210a
	IL1B	Interleukin 1 beta
	INPP5D	Inositol polyphosphate-5-phosphatase
	PILRA	Paired immunoglobulin-like type 2 receptor alpha
	PLSCR1	Phospholipid scramblase 1
	TGFBI	Transforming growth factor 1
TLR5	Toll-like receptor 5	
TMEM49	Vacuole membrane protein 1	

Lists of disease-associated top-100 genes that correlated with *Iba-1* were compared. Transcripts that are disease-specific are presented. Only genes that are immune-related based on GO ontology and analysis of the literature are presented.

Amyotrophic lateral sclerosis (ALS): Microarray analyses were performed on spinal cord samples obtained from patients suffering from ALS, a neurodegenerative disease characterized by the progressive loss of motor neurons. Among the ALS-specific genes that correlated with *Iba-1* (*CD4*, *CORO1A*, *CTSD*, *DSE*, *GRN*, *IKBKE*, *ITGAL*, *LAIR1*, *LAT2*, *MAN2B1*, *SIP1*), *Granulin (GRN)* and *Cathepsin D (CTSD)* were previously shown to be specifically involved in ALS pathophysiology. Thus, up-regulation of *GRN* was demonstrated in macrophages/microglia during ALS progression and Granulin was proposed to be a marker of motor neuron degeneration (Philips *et al.* 2010). Moreover, mutations in *GRN* have been identified in patients suffering from sporadic forms of ALS (Morris *et al.* 2012) and the intra-CNS accumulation of Granulin was shown to parallel the formation of TDP-43 protein aggregates (Kumar-Singh 2011), a neuropathological feature observed in ALS and some of its animal models. Also, up-regulation of *Cathepsin D* expression was demonstrated in the spinal cord of both patients suffering from ALS and mice harbouring a mutated *SOD1* gene, the most widely used animal model of ALS (Kawamata *et al.* 1992; Offen *et al.* 2009). Interestingly, compared to the other CNS disorders analyzed, the ALS macrophage/microglia molecular profile presented the highest enrichment in genes related to chemotaxis and in genes mediating the signalling of IL-6 and of several T-cell derived cytokines (Interferon- γ , IL-4, IL-5 and IL-2) (Fig. 2A and Table 3). This observation indicates that a robust inflammatory process, possibly orchestrated by T-cells, drives macrophage/microglia recruitment and activation in ALS spinal cords.

Huntington's disease (HD): Microarray analyses were performed on caudate nucleus samples from patients suffering from HD, a progressive neurodegenerative disorder caused by dominant polyglutamine expansion within the *Huntingtin (HTT)* gene. The accumulation of this protein is thought to be involved in striatal and cortical neuronal cell death. It is still unclear if neuroinflammation influences disease progression but microglial activation has been recognized as a constant neuropathological feature in HD brains (Sapp *et al.* 2001; Ellrichmann *et al.* 2013). Interestingly, of the HD-specific genes that correlated with *Iba-1* (*CDC20*, *CDCA5*, *CPVL*, *EBP41L3*, *HMHA1*, *MAF*, *PSME4*, *SLC11A2*, *STAT1*), only *PSME4* could be linked to HD pathophysiology owing to its role as a component of the proteasome complex (Labbadia & Morimoto 2013). Among the six pathologies analysed, HD presented the macrophage/microglia profile harbouring the lowest enrichment in immune-related genes (37%; Fig. 2B) and the lowest enrichment in genes of the complement system or involved in phagocytosis function (Fig. 2A). Accordingly, the 37 immune-related genes identified in the HD profile were composed of 13 genes belonging to the “common inflammatory denominator” of neurodegeneration, 9 genes

corresponding to the HD-specific macrophage/microglia molecular signature and 15 additional genes shared with two to four other disease-associated profiles. This result indicates that among the six pathologies analyzed, HD presented the lowest level of macrophage/microglia activation, an observation illustrated by the comparison between HD and MS molecular profiles (Fig. 2B).

Parkinson's disease (PD): Microarray analyses were performed on substantia nigra samples derived from patients suffering from PD, a neurodegenerative disorder affecting movement control and characterized by the progressive loss of dopaminergic neurons. As observed in other neurodegenerative disorders, neurons that degenerate in PD harbour intracytoplasmic inclusions of aggregated misfolded proteins that, in the case of PD, are essentially composed of α -synuclein molecules. In PD, activation of macrophages/microglia in response to and, possibly, amplifying neuronal cell death, is well accepted (McGeer *et al.* 1988; Barcia *et al.* 2011). Following our *in silico* approach, fifteen genes were identified as PD-specific (*CASP1*, *CD300A*, *GBP1*, *HLA-DOA*, *IL1RAP*, *ILF2*, *MRI1*, *PAG1*, *PEX13*, *PLAU*, *PSMA5*, *PSMB8*, *SFFV-SPI1*, *TLR1*, *TNFSF13B*). Among these, *Caspase-1* (*CASP1*), *Peroxisomal biogenesis factor 13* (*PEX13*) and the proteasome genes *PSMA5* and *PSMB8* have been previously linked to PD physiopathology (McKinnon & Tabrizi 2014), either directly or indirectly. Thus, Rotenone, a synthetic compound that induces dopaminergic neuronal cell death, was shown to trigger a *CASP1*-dependent pro-inflammatory cascade in microglial cells (Gao *et al.* 2013). Also, mice deficient in *PEX13* were found to develop intraneuronal α -synuclein inclusions (Yakunin *et al.* 2010). Interestingly, the PD-specific profile also included the Toll-like receptor *TLR1* and the ITIM-bearing (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-bearing) receptor *CD300A* that was recently shown to down-regulate the removal of apoptotic cells by macrophages (Simhadri *et al.* 2012). *TNFSF13B*, also known as *BAFF* (*B-cell activating factor*), was the only PD-specific identified gene coding for a secreted molecule. Finally, it is worth noting that among the six disease-associated profiles we identified, PD-associated macrophage/microglia molecular profile was the less enriched in chemotaxis-related genes (Fig. 2A).

Schizophrenia (SCZ): Microarray analyses were performed from cortical samples obtained from patients suffering from SCZ. SCZ, the most frequent psychotic disorder, is currently thought to involve neurodegenerative-like processes during which inflammatory mechanisms accompany, or possibly support, neuronal dysfunctions (Miller *et al.* 2011). The SCZ-specific macrophage/microglia molecular profile was composed of fourteen genes (*CD93*, *CFD*, *COTL1*, *FOS*, *FPR1*, *IFI16*, *IL10RA*, *IL1B*, *INPP5D*, *PILRA*, *PLSCR1*, *TGFB1*, *TLR5*, *TMEM49*) among which *IL10RA* (*Interleukin-10 receptor α*), *IL1B* (*Interleukin-1 β*), *TGFB1* (*Transforming growth factor β 1*) and *Complement factor D* (*CFD*, *Adiponectin*) were previously linked to SCZ

physiopathology and/or genetic susceptibility. In particular, several studies demonstrated that polymorphisms of the *IL-1 β* , *TGFB1* and/or *IL10* genes conferred a higher risk to develop SCZ (Xu & He 2010). Increased levels of these cytokines and of Adiponectin were also demonstrated in the serum and/or CSF of SCZ patients (Miller *et al.* 2011; Fatjó-Vilas *et al.* 2012; Song *et al.* 2013). Moreover, gene enrichment analysis showed that, in contrast with other disease-associated profiles, the IL-10-signaling pathway was over-represented in the SCZ macrophage/microglia profile (Fig. 2A). Overall, these results indicate that macrophages/microglia in SCZ engage an activation program that involves the anti-inflammatory genes *IL-10* and *TGFB1*. Finally, besides classical cytokines, our *in silico* analysis unravelled a SCZ-specific enrichment in genes of the MIF (macrophage migration inhibiting factor) signaling pathway and, most importantly, the Cholecystinin and the Histamine signaling pathways (Table 3). This result is of particular interest as MIF is emerging as a modulator of neurotransmission (Moon *et al.* 2012), and that Cholecystinin, a well known neuropeptide, and Histamine, a modulator of neurotransmission (Panula & Nuutinen 2013), were both involved in SCZ physiopathology (Arrang 2007; LaCrosse & Olive 2013).

5) Discussion

A number of neuropathology studies have documented the activation of macrophages/microglia in a large array of human CNS disorders, ranging from MS, the prototypical neuroinflammatory disease, to chronic neurodegenerative or psychiatric conditions. However, in the human CNS, the molecular mechanisms accompanying and supporting the main morphological and phenotypical changes characterizing macrophage/microglia "activation" are poorly understood. One of the reasons for this is the difficulty in reliably isolating macrophages/microglia from *post-mortem* human CNS tissue. In the present study, we opted for a virtual microdissection approach in order to identify common *vs.* disease-specific activation programs in six major CNS diseases: MS, PD, HD, ALS, AD and SCZ. This *in silico* analysis was performed on a large microarray data set generated from 118 human CNS samples by the BrainNet Europe network. This strategy offers relatively simple, cost-effective and time-sparing means to identify, with no *a priori*, cell-specific transcriptomic profiles from whole tissue microarray data. Nevertheless, several potential biases have to be kept in mind when interpreting data. In particular, the DNA microarray technology itself restricts the list of studied transcripts as opposed to the more recently developed RNA-seq technique (Nagalakshmi *et al.* 2010). Also, virtual microdissection is unlikely to be efficient when assessing poorly represented cell populations such as lymphocytes in the case of CNS neurodegenerative disorders. Also, our approach cannot discriminate blood-derived macrophages from genuine CNS-resident microglia, two cell populations that may not fully share molecular

behaviors (Prinz *et al.* 2011). Finally, the fact that we excluded gene transcripts that were not detected in all samples of a given group might have, to some extent, biased results while minimizing inter-individual variability.

Beyond the aforementioned methodological considerations, our study indicates that the activation of macrophages/microglia relies on a common molecular basis in CNS conditions that are distinct with regard to intra-CNS anatomical localization, physiopathology and time course. Identifying this common inflammatory denominator may allow new macrophage/microglia activation markers to be considered for future studies. These include in particular the B-cell antigen *CD75* and the *Lysophosphatidic acid receptor 5 (LPAR5)*. Interestingly, several pro-inflammatory genes considered as potential therapeutic targets were identified in this common grounding of neuroinflammation. This is especially the case of *NOX2*, a gene supporting superoxide production and previously involved in both microglia chemotaxis (Lelli *et al.* 2013) and macrophages/microglia-mediated neurotoxicity (Sorce & Krause 2009; Wang *et al.* 2013). Of note is also the inflammasome component *PYCARD*, which was shown to play a major role in microglial innate recognition of infection or tissue damage (Ransohoff & Brown 2012). Our study also confirms the great molecular plasticity of activated macrophages/microglia, a property that has been long suspected but not formally demonstrated in human CNS disorders (Perry *et al.* 2010; Cunningham 2013; Boche *et al.* 2013). Thus, besides sets of genes that are common to all disease-associated macrophage/microglia profiles, we obtained short lists of genes that form disease-specific molecular signatures of macrophage/microglia activation programs. In particular, mention should be made of *Osteopontin*, *Folate receptor 2* and *Chemokine-like factor* for MS, *Angiopoietin-1* and *PSME1* for AD, *Granulin* and *Cathepsin D* for ALS, *Peroxisomal biogenesis factor 13*, *CD300A* and *B-cell activating factor (BAFF)* for PD, *STAT1* and *PSME4* for HD and *Adiponectin*, *IL1 β* , *IL10RA* and *TGFBI* for SCZ. Whether these disease-specific signatures contribute to or simply reflect distinct types of neuronal alterations remains to be determined and deserve further studies. The potential use of some of these molecules as diagnostic and/or prognostic markers should be also considered.

Whether M1 vs. M2 macrophage nomenclature is relevant in the context of CNS disorders cannot be determined on the basis of our study. Nevertheless, it appears that such a classification is possibly too restrictive and does not reflect the full range of molecular profiles that macrophages/microglia may adopt depending on pathological conditions. Moreover, the temporal stability of such profiles can be questioned (Caras *et al.* 2011) as well as the impact of distinct CNS micro-environments determined by the localisation of disease-specific lesions. For example, in ALS models, macrophages/microglia were shown to display neuroprotective properties in cervical spinal cord but neurotoxic ones in lumbar spinal cord (Beers *et al.* 2012; Liao *et al.* 2012). Finally, the

data set analysed in the present study was by necessity obtained from patients in the later stages of CNS diseases. As a consequence, the macrophage/microglia profiles we identified are not representative of disease onset but rather reflect how chronic neuro-inflammation is self-perpetuated in a disease-specific manner. Some authors propose that acute stimulation drives M1 polarization whereas chronic stimulation results in a switch toward M2-like phenotypes (Ajmone-Cat *et al.* 2013). Others also consider that a molecular “memory” of successive cycles of activation/de-activation may occur in macrophages/microglia, translating into a priming state that reflects past rather than ongoing events (Perry *et al.* 2010; Cunningham 2013; Ajmone-Cat *et al.* 2013). In this scheme, the progression of CNS chronic disorders would be determined, at least partly, by such a process of memory also called trained innate immunity (Netea *et al.* 2011).

In any case, the exquisite degree of macrophage/microglia molecular plasticity is illustrated by the comparison between disease-associated profiles and their respective genomic enrichment in distinct functional pathways. That chemotaxis and T-cell-cytokine signaling pathways presented the highest enrichment in the ALS rather than the MS profile is unexpected and confers a major role for blood-derived CNS-infiltrating T-cells in the physiopathology of ALS. While supported by previous studies (Zhao *et al.* 2014), results provide unique cues on the specificity of such a finding. Similarly, that genes related to antigen presentation or to the complement system presented the highest enrichment in the AD rather than the MS profile highlights the importance of innate immune mechanisms in AD physiopathology. Finally, the SCZ macrophage/microglia profile was uniquely enriched in signaling pathways of the neurotransmission modulators Cholecystokinin, MIF and Histamine.

MS being the neuroinflammatory disease of reference, a wealth of data is available on the innate immune mechanisms that develop during MS course (Hernández-Pedro *et al.* 2013). However, our results shed a new light on the level of specificity that such inflammatory mechanisms may present, relative to other CNS disorders. In fact, besides the identification of three MS-specific transcripts (*CKLF*, *FOLR2* and *SPPI*), no immune-related process or pathway was specifically enriched in the MS-associated macrophage/microglia molecular profile we identified. Nevertheless, this MS profile was the only condition to exhibit a significant enrichment in genes involved in the RNA translation process (additional Table 1), which possibly indicates that MS-associated macrophages/microglia harbour the most activated phenotype in terms of protein synthesis. Interestingly also, the signaling pathways of several immune or immuno-active molecules were specifically enriched in the MS-associated neuronal profile. These include the signaling pathways of leptin, androgens and the anti-inflammatory cytokines IL-13 and IL-4 (along with the SCZ profile) (additional Table 2). Determining whether such a unique “neuronal activation

program” participates to or prevent neuronal dysfunctions and/or cell death in cortical MS lesions deserves further attention.

6) Additional tables

Additional table 1: Gene ontology enrichment of disease-associated macrophage/microglia profiles

	MS	ALS	PD	AD	HD	SCZ
Immune response_Phagosome in antigen presentation	9.8E-12	8.1E-10	7.8E-14	1.7E-16	0.00039	8.8E-14
Immune response_Phagocytosis	1.8E-09	2E-11	2.6E-11	8.4E-11	0.00021	1.4E-14
Inflammation_Complement system	5.5E-09	0.000000026	0.0000004	1.7E-10	0.42	5.5E-09
Cell adhesion_Leucocyte chemotaxis	0.000014	0.000000058	0.000027	0.0000012	0.00012	0.00000004
Inflammation_TREM1 signaling	0.000028	0.00000001	0.014	0.00000027	0.092	0.0011
Inflammation_Innate inflammatory response	0.00017	0.0000011	0.0000096	0.0006	0.15	0.00000061
Translation_Elongation-Termination	0.00023	1	1	1	1	1
Translation_Elongation-Termination_test	0.00023	1	1	1	1	1
Translation_Translation initiation	0.00057	1	1	1	1	1
Inflammation_Neutrophil activation	0.00065	0.000042	0.000048	0.002	0.0011	0.000026
Inflammation_IL-4 signaling	0.0016	0.00011	0.0052	0.00019	0.053	0.00026
Inflammation_Histamine signaling	0.0025	0.0045	0.0049	0.0071	0.021	0.00000053
Chemotaxis	0.004	0.0000058	0.011	0.00055	0.0033	0.004
Inflammation_IFN-gamma signaling	0.0072	0.000084	1	0.11	0.2	0.0072
Cell adhesion_Integrin-mediated cell-matrix adhesion	0.0092	0.0044	1	0.007	0.21	0.0092
Immune response_IL-5 signalling	0.012	0.000059	0.009	0.000088	0.0041	0.0014
Immune response_BCR pathway	0.018	0.0000058	0.0021	0.000086	0.27	0.00012
Inflammation_IgE signaling	0.018	0.0021	0.00038	0.0032	0.27	0.000019
Apoptosis_Anti-Apoptosis mediated by external signals by Estrogen	0.024	0.00036	0.016	0.086	1	0.096
Cell adhesion_Cell-matrix interactions	0.03	1	1	0.19	1	1
Cell adhesion_Integrin priming	0.033	0.000084	0.093	0.028	0.2	0.0013
Inflammation_NK cell cytotoxicity	0.035	0.00097	0.077	0.0000072	0.12	0.035
Inflammation_Amphoterin signaling	0.041	0.11	1	0.035	0.22	0.14
Immune response_TCR signaling	0.043	0.0065	0.007	0.0022	0.04	0.012
Cell adhesion_Platelet-endothelium-leucocyte interactions	0.044	0.089	0.028	0.0023	0.14	0.044
Inflammation_Kallikrein-kinin system	0.054	1	0.0093	0.045	1	0.00095
Immune response_T helper cell differentiation	0.071	0.047	0.049	0.061	0.02	0.0046
Signal transduction_CREM pathway	0.094	1	1	0.28	1	1
Cell adhesion_Glycoconjugates	0.11	0.005	0.078	0.0075	0.35	0.036
Signal Transduction_Cholecystokinin signaling	0.11	0.083	0.085	0.1	1	0.00016
Transport_Iron transport	0.11	1	1	1	0.041	1
Inflammation_Interferon signaling	0.12	0.09	0.093	0.028	0.2	0.033
Apoptosis_Anti-apoptosis mediated by external signals via NF-kB	0.12	1	0.095	1	1	1
Cell adhesion_Platelet aggregation	0.13	0.00025	0.028	0.00045	1	0.00012
Cell adhesion_Attractive and repulsive receptors	0.13	0.0067	1	0.11	0.37	1
Reproduction_Feeding and Neurohormone signaling	0.2	0.00088	0.15	0.069	0.2	0.00048
Proliferation_Lymphocyte proliferation	0.21	0.016	0.15	0.18	0.21	0.084
Cytoskeleton_Macropinocytosis and its regulation	0.24	1	0.2	0.22	0.13	0.014
Proteolysis_ECM remodeling	0.24	1	1	1	1	1
Apoptosis_Anti-Apoptosis mediated by external signals via PI3K/AKT	0.26	1	0.19	0.098	1	0.12
Blood coagulation	0.28	1	0.24	0.076	1	0.086
Inflammation_IL-2 signaling	0.32	0.00047	1	0.0075	1	0.11
Proliferation_Negative regulation of cell proliferation	0.33	0.032	0.27	0.13	0.046	0.14
Cytoskeleton_Regulation of cytoskeleton rearrangement	0.33	0.032	1	0.3	0.046	0.052
Inflammation_Inflammasome	0.35	0.094	0.097	0.33	0.05	0.13
Inflammation_IL-6 signaling	0.38	0.028	1	0.13	1	0.14
Protein folding_Folding in normal condition	0.38	1	0.11	0.36	0.22	1
Neurophysiological process_Melatonin signaling	0.38	1	1	1	1	0.082
Apoptosis_Death Domain receptors & caspases in apoptosis	0.4	0.12	0.12	0.14	0.23	1
Development_Hemopoiesis, Erythropoietin pathway	1	0.0019	0.15	0.0075	0.27	0.017
Inflammation_Jak-STAT Pathway	1	0.035	0.28	0.047	0.16	0.057
Inflammation_IL-10 anti-inflammatory response	1	0.052	1	1	1	0.015
Inflammation_IL-13 signaling pathway	1	0.058	1	1	1	1
Proliferation_Positive regulation cell proliferation	1	0.062	1	0.41	1	1
Development_Melanocyte development and pigmentation	1	0.084	1	1	1	1
Cell adhesion_Cadherins	1	0.096	1	1	1	1
Cardiac development_Role of NADPH oxidase and ROS	1	0.14	1	0.41	1	1
Inflammation_MIF signaling	1	0.15	0.012	0.44	0.28	0.00086
Regulation of metabolism Bile acid regulation of lipid metabolism and negative FXR-dependent regulation of bile	1	0.15	1	1	0.41	1

acids concentration						
Apoptosis_Apoptotic mitochondria	1	0.17	0.17	1	1	1
Signal Transduction_TGF-beta, GDF and Activin signaling	1	0.18	0.19	1	1	0.087
Development_Neurogenesis_Axonal guidance	1	0.18	1	1	1	1
Neurophysiological process_Melatonin signaling	1	1	0.066	1	0.27	1
Protein folding_ER and cytoplasm	1	1	0.072	1	1	1
Proteolysis_Ubiquitin-proteasomal proteolysis	1	1	0.08	1	1	1
Inflammation_Protein C signaling	1	1	0.089	1	1	0.12
Protein folding_Response to unfolded proteins	1	1	0.15	1	1	1
Neurophysiological process_Long-term potentiation	1	1	0.19	1	0.46	1
Muscle contraction_Relaxin signaling	1	1	0.2	1	1	0.064
Apoptosis_Anti-Apoptosis mediated by external signals via MAPK and JAK/STAT	1	1	0.26	1	1	1
Transport_Manganese transport	1	1	0.28	1	1	1
Neurophysiological process_Taste signaling	1	1	0.29	1	1	1
Development_Blood vessel morphogenesis	1	1	1	0.091	1	0.013
Transcription_Chromatin modification	1	1	1	0.39	1	1
Inflammation_IL-12,15,18 signaling	1	1	1	1	0.071	1
Signal transduction_Nitric oxide signaling	1	1	1	1	0.14	1
Cell cycle_Meiosis	1	1	1	1	0.19	1
Cytoskeleton_Spindle microtubules	1	1	1	1	0.19	1
Transcription_mRNA processing	1	1	1	1	0.33	1
Cytoskeleton_Actin filaments	1	1	1	1	0.38	1
Cell cycle_Mitosis	1	1	1	1	0.39	1
Development_Neurogenesis in general	1	1	1	1	0.42	1
Cell cycle_G2-M	1	1	1	1	0.45	1
Immune response_Innate immune response to RNA viral infection	1	1	1	1	0.46	1
Development_Neuromuscular junction	1	1	1	1	1	0.08
Development_Regulation of angiogenesis	1	1	1	1	1	0.1
Neurophysiological process_Corticoliberin signaling	1	1	1	1	1	0.1
Autophagy_Autophagy	1	1	1	1	1	1
Cardiac development_Wnt_beta-catenin. Notch. VEGF. IP3 and integrin signaling	1	1	1	1	1	1
Muscle contraction	1	1	1	1	1	1
Cell adhesion_Synaptic contact	1	1	1	1	1	1
Development_ERK5 in cell proliferation and neuronal survival	1	1	1	1	1	1
DNA damage_Core	1	1	1	1	1	1
Cell cycle_S phase	1	1	1	1	1	1
Development_Regulation of telomere length	1	1	1	1	1	1
Cell cycle_G1-S	1	1	1	1	1	1
Development_Keratinocyte differentiation	1	1	1	1	1	1
Translation_Translation initiation	1	1	1	1	1	1
Proteolysis_Proteolysis in cell cycle and apoptosis	1	1	1	1	1	1
Apoptosis_Apoptosis stimulation by external signals	1	1	1	1	1	1
Signal transduction_WNT signaling	1	1	1	1	1	1
Transport_Calcium transport	1	1	1	1	1	1
Reproduction_Progesterone signaling	1	1	1	1	1	1
Muscle contraction_Nitric oxide signaling in the cardiovascular system	1	1	1	1	1	1
Neurophysiological process_GABAergic neurotransmission	1	1	1	1	1	1
Development_Ossification and bone remodeling	1	1	1	1	1	1
Reproduction_FSH-beta signaling pathway	1	1	1	1	1	1
Development_Skeletal muscle development	1	1	1	1	1	1

Lists of top-100 genes that correlated with *Iba-1* were analyzed with regard to their level of enrichment in specific GO pathways or processes. The significant cut-off is 0.05 (E-x denotes 10^{-x}).

Additional table 2: Gene ontology enrichment of disease-associated neuronal profiles

	MS	ALS	PD	AD	HD	SCZ
Signal transduction_ERBB-family signaling	0.00022	1	1	1	1	1
Cytoskeleton_Intermediate filaments	0.00029	0.12	0.0000019	1	0.13	0.054
Cytoskeleton_Macropinocytosis and its regulation	0.00035	1	1	1	1	1
Translation_Regulation of initiation	0.0016	1	1	0.46	1	0.12
Signal transduction_Androgen receptor signaling cross-talk	0.003	1	1	1	1	1
Signal transduction_Insulin signaling	0.0052	1	1	1	1	1
Inflammation_IL-13 signaling pathway	0.0058	0.49	1	1	1	1
Signal transduction_Leptin signaling	0.0088	1	1	0.4	1	1
Cytoskeleton_Cytoplasmic microtubules	0.011	0.2	0.21	0.43	1	1
Signal transduction_ESR1-nuclear pathway	0.011	0.47	1	1	1	1
Inflammation_IL-4 signaling	0.011	1	1	0.1	1	0.016
Protein folding_Folding in normal condition	0.012	0.58	1	0.11	1	1
Protein folding_ER and cytoplasm	0.014	1	1	0.19	1	1
Cell cycle_G1-S Interleukin regulation	0.015	0.61	1	1	1	1
Protein folding_Protein folding nucleus	0.023	1	1	0.24	1	0.029

Protein folding_Response to unfolded proteins	0.032	1	1	0.28	1	1
Cytoskeleton_Actin filaments	0.034	0.14	0.74	1	0.4	0.047
Development_Neurogenesis_Synaptogenesis	0.036	0.0000049	0.000000005	1	0.00042	0.05
Cell adhesion_Amyloid proteins	0.044	0.42	0.77	1	0.19	1
Cell cycle_G1-S Growth factor regulation	0.044	0.42	1	1	0.063	1
Signal transduction_ESR1-membrane pathway	0.051	1	1	1	1	0.065
Reproduction_Progesterone signaling	0.054	0.2	0.47	1	1	1
Apoptosis_Anti-Apoptosis mediated by external signals via PI3K/AKT	0.067	1	1	0.31	1	1
Development_EMT_Regulation of epithelial-to-mesenchymal transition	0.067	1	1	1	1	1
Cell cycle_Meiosis	0.068	1	0.0077	0.4	1	1
Signal transduction_NOTCH signaling	0.069	1	1	1	1	0.094
Cytoskeleton_Spindle microtubules	0.072	0.19	0.0085	1	1	1
Immune response_Phagosome in antigen presentation	0.075	1	1	0.32	1	1
Development_Hedgehog signaling	0.083	0.56	1	1	0.31	0.11
Development_Hemopoiesis. Erythropoietin pathway	0.1	0.26	1	1	0.28	0.13
Reproduction_Spermatogenesis, motility and copulation	0.1	1	1	1	0.26	1
Neurophysiological process_GABAergic neurotransmission	0.11	0.000059	0.0035	0.14	0.29	0.026
Signal Transduction_TGF-beta1 GDF and Activin signaling	0.13	1	1	1	0.11	1
Cell adhesion_Cell junctions	0.14	1	0.032	1	1	0.17
Cell adhesion_Glycoconjugates	0.14	1	0.71	1	0.13	1
Reproduction_FSH-beta signaling pathway	0.14	1	1	1	0.35	0.0059
Translation_Translation initiation	0.15	1	1	0.047	1	1
Cell cycle_Mitosis	0.16	0.38	0.002	1	1	1
Signal transduction_WNT signaling	0.16	1	0.74	0.21	0.16	1
Immune response_IL-5 signalling	0.16	1	1	1	1	1
Cell adhesion_Cadherins	0.17	0.38	0.39	1	0.16	1
Cytoskeleton_Regulation of cytoskeleton rearrangement	0.17	0.39	0.15	1	0.17	1
Inflammation_Kallikrein-kinin system	0.17	1	1	1	1	1
Transport_Potassium transport	0.18	0.41	0.17	1	0.059	1
Development_Neurogenesis in general	0.18	1	0.77	1	0.0034	0.058
Development_Melanocyte development and pigmentation	0.18	1	1	1	0.32	1
Immune response_Antigen presentation	0.19	1	0.77	0.066	1	1
Transcription_Nuclear receptors transcriptional regulation	0.19	1	1	1	1	1
Cell cycle_G2-M	0.2	1	0.0039	1	1	1
Autophagy_Autophagy	0.2	1	1	0.23	1	1
Cell adhesion_Leucocyte chemotaxis	0.2	1	1	1	1	1
Transport_Synaptic vesicle exocytosis	1	0.0000041	0.00000005	0.05	0.011	1
Neurophysiological process_Transmission of nerve impulse	1	0.00079	0.02	0.017	0.00019	0.073
Reproduction_Gonadotropin regulation	1	0.0031	0.18	0.24	0.2	0.013
Neurophysiological process_Olfactory transduction	1	0.0082	1	1	0.14	1
Cell adhesion_Synaptic contact	1	0.044	0.0023	1	0.013	0.0098
Development_Neurogenesis_Axonal guidance	1	0.086	0.00026	1	0.000056	0.0038
Signal transduction_Neuropeptide signaling pathways	1	0.1	0.69	1	0.12	0.034
Signal transduction_ESR2 pathway	1	0.11	0.44	1	1	0.049
Signal transduction_Nitric oxide signaling	1	0.13	0.48	0.34	1	0.0076
Muscle contraction	1	0.13	0.73	0.0088	0.002	0.0079
Transport_Calcium transport	1	0.16	0.42	0.23	0.0034	1
Neurophysiological process_Visual perception	1	0.21	1	1	1	1
Neurophysiological process_Melatonin signaling	1	0.27	0.27	1	0.28	1
Development_Skeletal muscle development	1	0.28	0.66	1	0.31	1
Neurophysiological process_Corticoliberin signaling	1	0.3	1	1	0.054	1
Reproduction_GnRH signaling pathway	1	0.34	1	0.19	0.14	0.0068
Neurophysiological process_Circadian rhythm	1	0.43	1	0.31	0.12	0.048
Signal transduction_Oxytocin signaling	1	0.44	1	0.32	0.0032	0.052
Neurophysiological process_Long-term potentiation	1	0.45	1	1	1	1
Transport_Sodium transport	1	0.51	0.028	1	0.27	1
Translation_Elongation-Termination	1	0.51	0.52	1	1	1
Translation_Elongation-Termination_test	1	0.51	0.52	1	1	1
Inflammation_IL-2 signaling	1	0.54	1	0.39	1	0.012
Reproduction_Male sex differentiation	1	0.54	1	1	0.04	1
Signal Transduction_Cholecystokinin signaling	1	0.54	1	1	0.048	0.013
Cell adhesion_Integrin priming	1	0.56	1	1	1	0.091
Inflammation_IFN-gamma signaling	1	0.56	1	1	1	1
Cell cycle_Core	1	0.57	0.21	0.43	1	1
Muscle contraction_Nitric oxide signaling in the cardiovascular system	1	0.6	0.61	0.12	0.25	1
Cardiac development_FGF_ErbB signaling	1	0.6	1	0.45	0.07	1
Signal transduction_Androgen receptor nuclear signaling	1	0.61	1	0.46	0.073	1
DNA damage_Checkpoint	1	1	0.013	1	1	1
Apoptosis_Apoptotic mitochondria	1	1	0.019	0.052	1	1
Cell adhesion_Attractive and repulsive receptors	1	1	0.04	1	1	0.0082
Inflammation_IL-6 signaling	1	1	0.058	0.44	1	0.017
Inflammation_TREM1 signaling	1	1	0.092	0.031	1	0.029
Development_Neuromuscular junction	1	1	0.095	1	0.1	0.03
Cell cycle_G1-S	1	1	0.12	1	1	1
Development_Regulation of angiogenesis	1	1	0.23	1	1	0.083

Cell cycle_S phase	1	1	0.3	0.033	1	1
Muscle contraction_Relaxin signaling	1	1	0.46	1	1	1
Development_Blood vessel morphogenesis	1	1	0.51	1	0.0078	0.087
Proteolysis_Proteolysis in cell cycle and apoptosis	1	1	0.61	0.45	1	1
Inflammation_MIF signaling	1	1	0.65	1	1	1
Cell adhesion_Platelet-endothelium-leucocyte interactions	1	1	0.73	1	1	1
Apoptosis_Apoptosis stimulation by external signals	1	1	1	0.0046	1	0.028
Development_Regulation of telomere length	1	1	1	0.026	1	1
Transport_Manganese transport	1	1	1	0.089	1	1
Apoptosis_Anti-apoptosis mediated by external signals via NF-kB	1	1	1	0.098	1	1
Transcription_mRNA processing	1	1	1	0.18	1	1
Response to hypoxia and oxidative stress	1	1	1	0.18	1	1
Proteolysis_Ubiquitin-proteasomal proteolysis	1	1	1	0.19	1	0.18
Translation_Translation in mitochondria	1	1	1	0.22	1	1
Reproduction_Feeding and Neurohormone signaling	1	1	1	0.26	1	1
Apoptosis_Endoplasmic reticulum stress pathway	1	1	1	0.34	1	1
Signal Transduction_BMP and GDF signaling	1	1	1	0.35	1	1
Transport_Iron transport	1	1	1	0.39	1	1
DNA damage_DBS repair	1	1	1	0.43	1	1
Apoptosis_Death Domain receptors & caspases in apoptosis	1	1	1	0.45	1	1
Immune response_BCR pathway	1	1	1	0.48	0.088	0.025
Cell adhesion_Platelet aggregation	1	1	1	1	0.011	1
Cardiac development_BMP_TGF_beta_signaling	1	1	1	1	0.061	1
Cardiac development_Wnt_beta-catenin, Notch, VEGF, IP3 and integrin signaling	1	1	1	1	0.11	1
Blood coagulation	1	1	1	1	0.16	1
Immune response_Phagocytosis	1	1	1	1	0.25	1
Cardiac development_Role of NADPH oxidase and ROS	1	1	1	1	0.27	1
Apoptosis_Anti-Apoptosis mediated by external signals via MAPK and JAK/STAT	1	1	1	1	0.4	1
Inflammation_Innate inflammatory response	1	1	1	1	0.41	1
Inflammation_Amphoterin signaling	1	1	1	1	1	0.002
Inflammation_Neutrophil activation	1	1	1	1	1	0.0031
Immune response_TCR signaling	1	1	1	1	1	0.008
Cell adhesion_Integrin-mediated cell-matrix adhesion	1	1	1	1	1	0.016
Proliferation_Positive regulation cell proliferation	1	1	1	1	1	0.018
Development_Neuromuscular junction	1	1	1	1	1	0.03
Signal transduction_CREM pathway	1	1	1	1	1	0.075
Inflammation_Histamine signaling	1	1	1	1	1	0.076
Inflammation_Protein C signaling	1	1	1	1	1	0.089
Inflammation_Interferon signaling	1	1	1	1	1	0.091
Inflammation_IgE signaling	1	1	1	1	1	0.13
Apoptosis_Apoptotic nucleus	1	1	1	1	1	0.17
Inflammation_NK cell cytotoxicity	1	1	1	1	1	0.18
Cell adhesion_Glycoconjugates	1	1	1	1	1	0.18

Lists of top-100 genes that correlated with *Calb-2* were analyzed with regard to their level of enrichment in specific GO pathways or processes. The significant cut-off is 0.05 (E-x denotes 10^{-x}).

Additional table 3: Disease-associated macrophage/microglia molecular profiles

MS	ALS	PD	AD	HD	SCZ						
ADORA3	0.74	ABI3	0.88	ABI3	0.91	ABCC4	0.78	ALOX5	0.75	ADORA3	0.64
ALOX5	0.61	APBB1IP	0.93	ADORA3	0.78	ADORA3	0.83	ALOX5AP	0.56	ALOX5	0.78
ALOX5AP	0.60	APOC2	0.89	AKR1A1	0.79	ALOX5AP	0.92	APBB1IP	0.74	ALOX5AP	0.83
APOC2	0.89	ARHGAP30	0.87	ALOX5	0.80	ANGPT1	0.81	APEX2	0.60	APAF1	0.63
ARHGDIB	0.69	ARHGDIB	0.95	APOC1	0.77	APBB1IP	0.90	APOC2	0.58	APOC2	0.83
ASAH1	0.62	ARPC3	0.87	APOC2	0.84	APOC2	0.89	APRT	0.63	ARHGAP15	0.72
B2M	0.64	ATP8B4	0.85	ATF6	0.78	ARHGAP30	0.79	ARHGAP15	0.58	ARHGAP4	0.85
BTK	0.81	BIN2	0.88	BTK	0.79	ARHGDIB	0.87	ARHGAP30	0.72	ARHGAP9	0.61
C1QA	0.75	BTK	0.84	BZW2	0.77	ATP8B4	0.83	ARHGDIB	0.61	ARHGDIB	0.73
C1QB	0.83	C1orf24	0.89	C1QA	0.84	B2M	0.76	ATP5G2	0.60	ATP8B4	0.66
C1QC	0.69	C1QA	0.95	C1QB	0.84	BTK	0.87	ATP8B4	0.82	BTK	0.89
C3	0.84	C1QB	0.90	C1QC	0.83	C1QA	0.89	BTK	0.68	C1orf24	0.65
CD14	0.75	C1QC	0.91	C3	0.84	C1QB	0.94	C10orf78	0.57	C1QA	0.90
CD68	0.82	C3	0.91	CASP1	0.80	C1QC	0.83	C19orf48	0.59	C1QB	0.86
CD74	0.74	C3AR1	0.87	CD14	0.87	C3	0.86	C1orf162	0.63	C1QC	0.87
CD86	0.61	CARD9	0.92	CD300A	0.79	C3AR1	0.86	C1orf85	0.61	C3	0.96
CENTA2	0.75	CD14	0.85	CD53	0.84	CARD9	0.80	C1QA	0.65	CD14	0.81
CKLF	0.60	CD4	0.89	CD68	0.81	CD37	0.78	C1QB	0.65	CD68	0.83
CMTM7	0.79	CD53	0.94	CD74	0.89	CD53	0.92	C20orf67	0.57	CD74	0.97
CREG1	0.63	CD74	0.89	CENTA2	0.79	CD68	0.80	C3orf54	0.60	CD86	0.78
CSF1R	0.70	CENTA2	0.91	COQ2	0.83	CD74	0.82	C7orf47	0.58	CD93	0.60
CTSC	0.70	CMTM6	0.91	CTSC	0.79	CD86	0.87	CD14	0.74	CDC25B	0.66
CTSZ	0.60	COQ2	0.91	CX3CR1	0.85	CECR1	0.76	CD68	0.72	CENTA2	0.88
CYBA	0.76	CORO1A	0.95	CYBA	0.85	CENTA2	0.93	CD74	0.64	CFD	0.61

CYBB	0.71	CTSD	0.83	CYBB	0.92	CMTM6	0.85	CDC20	0.56	CMTM7	0.75
CYFIP1	0.63	CYBA	0.93	DENND2D	0.77	CMTM7	0.88	CDCA5	0.58	COPB1	0.61
DKK3	0.69	CYBB	0.94	DSCR2	0.78	COQ2	0.83	CDK5RAP3	0.61	COTL1	0.59
DOCK11	0.67	CYFIP1	0.83	EBI3	0.81	CSF1R	0.76	CENTA2	0.66	CSF1R	0.85
DOCK2	0.80	DEF6	0.83	EHD4	0.76	CTSC	0.91	CHRAC1	0.56	CYBA	0.80
EBI3	0.79	DOCK2	0.85	FAM113B	0.79	CYBA	0.89	CLCA4	0.58	CYFIP1	0.62
EEF1A1	0.60	DOCK8	0.87	FCER1G	0.87	CYBB	0.90	CMTM7	0.58	FCER1G	0.85
EMILIN2	0.60	DSE	0.86	FKSG30	0.83	CYFIP1	0.81	CPVL	0.66	FOS	0.68
FCER1G	0.70	ENTPD1	0.84	FYB	0.80	DEF6	0.82	CREB5	0.57	FPR1	0.65
FOLR2	0.66	FGL2	0.86	GBP1	0.79	DOCK2	0.93	CSF1R	0.73	GJA5	0.64
FYB	0.70	GLT25D1	0.83	GLRX	0.76	DOCK8	0.81	CSTF2	0.59	GMFG	0.66
GLA	0.62	GMIP	0.84	GMFG	0.76	DSC2	0.78	CX3CR1	0.63	GPR92	0.76
GPR92	0.63	GMPPA	0.83	GNG10	0.80	ENTPD1	0.86	CXorf9	0.57	HAMP	0.73
GPSM3	0.60	GNA15	0.90	GPR92	0.76	FCER1G	0.93	CYBB	0.71	HAVCR2	0.82
HAMP	0.83	GNB2L1	0.84	HCK	0.82	FGL2	0.88	DEF6	0.68	HCK	0.80
HAVCR2	0.81	GPX1	0.88	HCST	0.93	FYB	0.89	DENND1C	0.61	HCLS1	0.80
HCK	0.69	GRN	0.85	HLA-DMB	0.83	GMFG	0.79	DOCK2	0.64	HCST	0.86
HCLS1	0.66	HCST	0.91	HLA-DOA	0.87	GPR92	0.79	DSN1	0.59	HLA-DMA	0.83
HCST	0.90	HLA-DPA1	0.84	HLA-DPA1	0.84	GPSM3	0.79	EBI3	0.57	HLA-DMB	0.85
HK2	0.70	HLA-DRB4	0.86	HLA-DRA	0.86	HAVCR2	0.86	EPB41L3	0.64	HLA-DPA1	0.80
HLA-DMB	0.62	IKBKE	0.85	IFI30	0.91	HCLS1	0.80	FUSIP1	0.59	HLA-DRB4	0.72
HLA-DPA1	0.69	IKIP	0.87	IL1RAP	0.76	HCST	0.85	FYB	0.60	HMOX1	0.66
HLA-DRA	0.71	IRF8	0.89	ILF2	0.77	HIST1H2BD	0.86	GMCL1	0.56	IER3	0.65
HLA-DRB4	0.71	ITGAL	0.84	ITGAM	0.77	HIST2H2AA3	0.78	GPR92	0.68	IFI16	0.61
HLA-E	0.60	ITGB2	0.91	KDEL2	0.86	HK2	0.84	H2AFJ	0.56	IGSF6	0.79
IFI30	0.76	KCNK13	0.89	LAP3	0.85	HLA-B	0.78	HAMP	0.59	IL10RA	0.81
IRF1	0.61	KCNK6	0.83	LAPTM5	0.87	HLA-DMA	0.76	HAVCR2	0.85	IL1B	0.68
ITGAM	0.73	LACTB	0.84	LCP2	0.78	HLA-DMB	0.86	HCK	0.74	IMPDH2	0.75
ITGB2	0.75	LAIR1	0.86	LRMP	0.77	HLA-DPA1	0.86	HCLS1	0.62	INPP5D	0.74
LAPTM5	0.77	LAT2	0.86	LST1	0.90	HLA-DRA	0.77	HCST	0.80	IRF8	0.79
LSM5	0.60	LHFPL2	0.94	LY86	0.91	HLA-DRB4	0.78	HIRIP3	0.57	ITGB2	0.93
LY86	0.76	LOC441168	0.86	LYN	0.90	IGSF6	0.77	HLA-DMA	0.75	KCTD12	0.71
LY96	0.63	LST1	0.86	MAFB	0.82	IRF8	0.80	HLA-DMB	0.75	LAPTM5	0.93
MCM5	0.68	LY86	0.92	MFSD1	0.81	ITGAM	0.83	HMHA1	0.59	LCP1	0.74
MGAT4A	0.75	MAN2B1	0.89	MGAT4A	0.88	ITGB2	0.83	HOM-TES-103	0.68	LCP2	0.68
MNDA	0.61	MAPKAPK3	0.86	MKNK1	0.80	KCTD12	0.83	IFI30	0.72	LY86	0.95
NCKAP1L	0.73	MBD3	0.86	MR1	0.88	LAP3	0.79	IGSF6	0.88	LYN	0.63
PLCG2	0.72	MNDA	0.86	MS4A6A	0.79	LCP1	0.83	ITGB2	0.66	MAFB	0.70
PLVAP	0.69	MS4A6A	0.83	MTHFD1L	0.81	LHFPL2	0.81	KBTBD3	0.63	MCM5	0.70
PRSS23	0.61	MYO1F	0.83	NAGA	0.78	LOC387882	0.76	LAPTM5	0.70	MS4A7	0.92
PSCD4	0.73	NCKAP1L	0.85	NCKAP1L	0.79	LOC400455	0.80	LRMP	0.58	MTHFD2	0.67
PSME2	0.77	PIK3CD	0.89	OBFC2A	0.81	LST1	0.82	LY86	0.88	NCF4	0.61
PYCARD	0.65	PLCG2	0.85	OLFML3	0.77	LY86	0.94	MAF	0.61	NCKAP1L	0.87
RAB31L1	0.63	PLEK	0.86	PAG1	0.77	LY96	0.80	MAFB	0.66	OLFML3	0.66
RGS1	0.66	PRKCD	0.87	PEX13	0.80	LYN	0.82	MKNK1	0.62	OLR1	0.77
RHBDF2	0.61	PSCD4	0.85	PIK3API	0.84	MNDA	0.76	MNDA	0.64	P2RY5	0.69
RPL26	0.60	PSME2	0.88	PLAU	0.78	MS4A6A	0.84	NCF4	0.68	PDLIM1	0.63
RPL38	0.67	PTPN6	0.83	PLCB2	0.85	MS4A7	0.78	NCKAP1L	0.82	PFN1	0.69
RPLP0	0.62	PYCARD	0.97	PLVAP	0.83	NCKAP1L	0.86	NDST2	0.56	PILRA	0.66
RPS12	0.65	RAB32	0.82	PSCD4	0.80	OLR1	0.83	P2RX4	0.63	PLCB2	0.78
RPS17	0.60	RCN3	0.87	PSMA5	0.78	P2RY5	0.81	P2RY13	0.58	PLCG2	0.67
RPS20	0.67	RGS18	0.84	PSMB8	0.79	PARVG	0.77	POLA2	0.67	PLEK	0.73
RPS29	0.72	RGS19	0.96	PSME2	0.84	PLCG2	0.81	PPP1R14A	0.58	PLSCR1	0.63
RPS6KA1	0.62	RNASE2	0.90	PSTPIP2	0.78	PLEK	0.86	PSCD4	0.79	PLVAP	0.70
RPUSD4	0.61	RPS16	0.83	PTPN6	0.84	PSME1	0.78	PSME4	0.60	POLD4	0.59
S100A11	0.60	S100A11	0.83	PTPRE	0.77	PTPN6	0.88	PYCARD	0.65	PYCARD	0.96
SERPINA1	0.63	S100A4	0.90	PYCARD	0.78	PYCARD	0.94	REC8L1	0.64	RAC2	0.71
SLC15A3	0.68	SCIN	0.84	RGS19	0.82	RGS19	0.83	RFWD3	0.70	RGS10	0.67
SLC2A5	0.71	SH3BP1	0.83	SCIN	0.79	S100A11	0.79	RGS10	0.56	RGS16	0.61
SLC7A7	0.68	SIGLEC10	0.84	SEC24D	0.78	SCIN	0.83	RNASET2	0.58	RHBDF2	0.83
SLCO2B1	0.62	SIL1	0.83	SERPINB1	0.86	SERPINA1	0.81	S100A11	0.57	S100A11	0.65
SPP1	0.62	SIPA1	0.90	SFFV-SPI1	0.89	SLA	0.89	SCIN	0.56	SERPINA1	0.71
ST6GAL1	0.60	SLC25A19	0.84	SIGLEC10	0.80	SLC2A5	0.79	SERPINA1	0.61	STB3	0.64
STAB1	0.73	ST6GAL1	0.88	SLC2A5	0.85	SLC7A7	0.91	SLC11A2	0.59	SLA	0.77
STEAP3	0.68	STXBP2	0.83	SOAT1	0.88	SPI1	0.83	SLC2A5	0.73	SLC2A5	0.88
TCN2	0.62	SYK	0.86	SSR1	0.83	ST6GAL1	0.90	SLC7A7	0.57	SLC7A7	0.84
TMEM149	0.67	TPCN2	0.84	ST6GAL1	0.77	SYK	0.90	STAT1	0.57	SPI1	0.83
TNFRSF1B	0.60	TREM2	0.88	TLR1	0.91	TBXAS1	0.78	STMN4	0.58	ST6GAL1	0.65
TNFSF5IP1	0.70	TRIM21	0.84	TMEM119	0.76	TNRC5	0.80	TM6SF1	0.61	STAB1	0.77
TYROBP	0.82	TSPO	0.90	TNFSF13B	0.81	TREM2	0.85	TMEM119	0.61	STXBP2	0.73
UXT	0.64	TYROBP	0.83	TREM2	0.85	TRIM22	0.77	TMEM5	0.60	TBXAS1	0.60
VAMP8	0.81	UCP2	0.83	TYROBP	0.81	TYROBP	0.92	TYROBP	0.58	TGFBI	0.62
VSIG4	0.60	VAMP8	0.85	UCP2	0.91	VAMP8	0.82	TYSND1	0.59	TLR5	0.70
WAS	0.66	VSIG4	0.84	WAS	0.80	WAS	0.86	VAMP8	0.64	TMEM49	0.64
								WAS	0.70	VSIG4	0.66
								ZNF289	0.66	WAS	0.84

For each pathology, the top-100 genes whose expression values correlated with those of *Iba-1* across samples were identified. The Spearman ρ coefficient calculated for each gene is presented in this table.

**DISCUSSION GENERALE et
PERSPECTIVES**

A. Les profils d'activation macrophagique/microgliale dans la SEP

Les macrophages ont très vite été suspectés de détruire les gaines de myéline dans la SEP. Simultanément, les connaissances relatives aux cellules microgliales avançaient et il devenait bien difficile de distinguer la microglie « en action » des macrophages infiltrants. La démonstration des macrophages/cellules microgliales pris en « flagrant délit » de phagocytose des débris myéliniques, que nous avons évoquée, n'était donc pas un scoop. L'originalité de cette thèse repose davantage sur la démarche utilisée pour s'approcher au plus près de la réponse macrophagique/microgliale qui s'installe et semble perdurer chez les patients atteints de formes progressives de la maladie. Tout s'est passé comme si nous avions pris une loupe de plus en plus puissante dans l'espoir de décrypter les secrets de cette réponse cellulaire.

Le nombre d'études neuropathologiques qui ont étudié l'activation macrophagique/microgliale en conditions pathologiques est impressionnant. Un échantillon en est cité dans la partie bibliographique. Les changements morphologiques des cellules microgliales et leur comportement migratoire *in vivo* ont été décrits de manière exhaustive. Dans le cerveau sain, les cellules microgliales étendent de nombreuses ramifications qui sondent en permanence le milieu interstitiel cérébral. En conditions pathologiques, elles sont activées : elles acquièrent une morphologie amiboïde, non distinguable de celle des macrophages, relarguent un large éventail de molécules solubles (cytokines et facteurs de croissance) et peuvent exercer des fonctions cytotoxiques (Davalos *et al.* 2005). Cependant, chez l'homme, les mécanismes moléculaires qui accompagnent ces changements ne sont pas encore bien connus, et les programmes d'activation qui en résultent, encore moins. Ceci est sans doute dû aux difficultés techniques liées à l'isolement de macrophages/cellules microgliales à partir de tissu nerveux *post-mortem*. Nos deux études ont donc apporté leur pierre à l'édifice.

1) L'identification des profils d'activation : critique de la méthode

A l'aide de deux approches différentes, mais complémentaires, nous avons pu mettre en évidence des signatures moléculaires de l'activation macrophagique/microgliale au cours de la SEP.

Vers une compréhension des mécanismes cellulaires de l'altération tissulaire

La première étude a débuté par une analyse neuropathologique classique qui nous a permis de distinguer différents types de plaques de démyélinisation selon leur niveau d'activation, conformément à la nomenclature en vigueur. L'habitude aurait voulu que l'on s'attarde sur les profils d'activation macrophagique/microgliale au cœur des plaques de démyélinisation comme l'ont déjà fait d'autres études (Voss *et al.* 2012; Rawji & Yong 2013; Cao & He 2013). Celles-ci démontrent des propriétés de type M1 ou bien de type M2 suivant le stade de la lésion ou le degré de remyélinisation. C'est ainsi que des profils « protecteurs » ou du moins « favorables » à la réparation tissulaire ont été mis en évidence (Napoli & Neumann 2010; Voss *et al.* 2012; Olah *et al.* 2012). Mais que reste-t-il de myéline dans les plaques démyélinisées ? Comment comprendre l'action des macrophages/cellules microgliales alors que la « bataille » a déjà eu lieu ? Notre œil de biologiste ne pouvait s'arrêter là. Face à l'étendue dramatique des altérations tissulaires observées au pourtour des plaques sur des sections de moelle épinière de patients SEP, nous avons opté pour l'analyse de l'activité des macrophages/cellules microgliales au sein de ces zones endommagées, que nous avons nommé LDP : lésions de démyélinisation de la périplaque. Cette question nous paraissait essentielle devant l'ampleur de la dégradation tissulaire, d'autant plus inquiétante au plan fonctionnel qu'il n'y a ni redondance ni compensation possible dans la moelle épinière.

Le choix d'échantillons *post-mortem* de qualité pour les analyses transcriptomiques

Les échantillons *post-mortem* ont d'abord été soigneusement choisis, pour leurs données cliniques, mais aussi pour leur bonne préservation tissulaire et moléculaire. Depuis quelques années, l'organisation des banques de tissus *post-mortem*, comme celle de la banque de tissus londonienne avec laquelle nous avons collaboré activement, se réforme et s'améliore continuellement afin d'offrir aux chercheurs des tissus traités de façon homogène et de très bonne qualité (Durrenberger *et al.* 2010). Nous avons ainsi pu réaliser une étude transcriptomique de qualité sur 10 cas *post-mortem*. Si beaucoup sont étonnés de ne pas voir de cas contrôles dans notre étude, il s'agit pour moi d'un point fort. En effet, en comparant l'expression génique au sein des LDP à celle de tissus sains d'individus contrôles, les informations apportées n'auraient pas été celles que nous recherchions. L'analyse transcriptomique à partir de tissus humains est effectivement très sensible aux variabilités techniques comme génétiques et nous aurions alors fait apparaître des différences interindividuelles, qui répondent davantage à la question de savoir

pourquoi certaines personnes développent la SEP, question fondamentale d'un grand intérêt mais en dehors du champ d'investigation que nous avons choisi. Au contraire, si l'on se place dans une optique de recherche biomédicale visant *in fine* à soigner les personnes qui souffrent de SEP, ce que nous recherchions concernait les altérations cellulaires et moléculaires qui contribuent à l'extension des lésions de SEP. C'est pourquoi nous avons comparé le profil transcriptomique des LDP microdisséquées à un contrôle interne au patient étudié, c'est-à-dire le tissu sain adjacent, que l'on appelle SBAN (Substance blanche d'apparence normale) dans le « jargon » des neuropathologistes de la SEP. On ne pouvait être certain que l'échantillon de SBAN, pris ici comme référence, n'appartenait pas à la périplaque d'une autre lésion, par exemple localisée à proximité sur l'axe longitudinal de la moelle épinière. Néanmoins, il n'en reste pas moins un tissu moins altéré que celui de la LDP et c'était bien le différentiel entre les deux qui nous intéressait pour comprendre les modifications cellulaires et moléculaires qui s'opèrent dans les LDP.

De la même façon, la grande qualité du jeu de données transcriptomiques généré par le réseau BrainNet Europe nous a permis de valider notre approche de microdissection virtuelle en l'appliquant à 118 échantillons *post-mortem* ayant subi exactement les mêmes traitements, depuis le prélèvement jusqu'à la normalisation des puces d'expression. Les ARN, extraits de tissus « frais », y sont extrêmement bien conservés, contrairement à ceux issus de tissus fixés ou paraffinés (Durrenberger *et al.* 2010). Sans la mise en commun de ces données, sur laquelle repose la vocation du réseau BrainNet Europe, nous n'aurions pas pu avoir accès à un si grand jeu de données homogènes, nous permettant non seulement d'analyser les macrophages/cellules microgliales des lésions corticales de la SEP mais aussi de les comparer à cinq autres pathologies du SNC.

Les analyses transcriptomiques, comme toutes les autres études « -omiques », ont l'énorme avantage d'observer les échantillons sans *a priori*, sans idées préconçues de ce que nous voulons observer. En effet, les études histologiques, protéiques ou moléculaires, à petite échelle, comme on a l'habitude de le faire, puisque moins coûteuses, sont souvent restreintes à l'utilisation de quelques marqueurs connus. Les hypothèses pré-existantes, s'appuyant, certes, sur des résultats antérieurs, sont alors contraignantes. Au contraire, depuis les années 90, les études transcriptomiques offrent la possibilité de mesurer des milliers de gènes simultanément et ouvrent ainsi de nouvelles pistes, sans doute parfois trop nombreuses pour être approfondies. L'élaboration des hypothèses n'intervient alors qu'après l'élaboration des données (Brenner 2010). Ce « déluge de données » ne s'est accompagné que, secondairement, du développement d'outils d'analyse performants. C'est en nous appuyant sur ces nouveaux outils d'analyse que nous avons étudié la transcriptomique des lésions de SEP dans nos deux études. Concernant l'analyse des LDP, nous avons pu valider les données transcriptomiques obtenues par des analyses histologiques et protéiques. Notre deuxième lot de données, issu de la méthode de microdissection virtuelle, a pu uniquement être confronté à la

littérature puisque nous ne disposons pas des échantillons. Cette méthode, qui compare les types cellulaires entre eux, est peu coûteuse et relativement rapide à maîtriser. Elle a permis de répondre, au moins partiellement, aux questions initialement posées, relatives à la nature et à la spécificité des programmes d'activation macrophagique/microgliale dans les lésions SEP par rapport aux autres pathologies du SNC.

Les limites associées à l'étude d'échantillons *post-mortem*

La difficulté, lorsque l'on travaille sur des échantillons humains *post-mortem*, est de savoir dans quelles mesures les résultats obtenus sont liés aux processus pathologiques ou à des artefacts secondaires aux conditions d'extraction du tissu et/ou au décès du patient. Par exemple, l'activité phagocytaire est très faible dans les études anatomopathologiques car le marquage ORO utilisé pour marquer les phagocytes ayant ingérés de la myéline n'est efficace que quelques heures après le début de la phagocytose. Cet état de fait conduit probablement à sous-estimer l'activité des plaques et pourrait contribuer à rendre les plaques actives beaucoup moins fréquentes que les plaques chroniques.

De plus, dans nos études, les patients sont, le plus souvent, relativement âgés et décédés dans un contexte de complications liées à la SEP. Les observations qui en résultent témoignent donc de stade tardif de la maladie alors que nous aurions souhaité qu'elles nous aident à comprendre la progression réelle de la maladie.

Enfin, nos résultats ne s'appliquent qu'à une petite cohorte de patients que l'on ne peut prétendre représentative de l'ensemble des patients. Toutefois, on peut se demander s'il est pertinent, outre le coût financier occasionné, de toujours augmenter le nombre de patients d'une étude si la fenêtre de sélection en est agrandie et la qualité amoindrie. En effet, les larges effectifs risquent d'induire une hétérogénéité clinique, biologique et de qualité des échantillons.

Néanmoins, ayant conscience des limites des échantillons *post-mortem*, ils représentent une ressource inestimable pour mieux comprendre la physiopathologie de la SEP.

Une impossible distinction entre macrophages et cellules microgliales

Comme annoncé plus haut, il ne nous a pas été possible de différencier les cellules microgliales activées des macrophages infiltrés, dérivés du sang. Une équipe a réalisé une étude phénotypique et fonctionnelle afin de distinguer les propriétés des cellules microgliales humaines avec celles des macrophages en imposant des conditions de différenciation de type M1 ou M2

(Durafour *et al.* 2012). Elle a montré que les cellules microgliales répondent bien aux deux types de stimuli mais n'adoptent pas exactement les mêmes phénotypes que les macrophages. Même s'il est bien accepté que les deux populations cellulaires ne partagent pas complètement les mêmes comportements moléculaires (Prinz *et al.* 2011), nous sommes partis du postulat qu'elles partagent une grande partie des programmes d'activation engagés en réponse à un contexte inflammatoire donné.

Pertinence de la nomenclature M1 vs. M2 ?

De même, nous n'avons pas pu déterminer formellement la pertinence de l'utilisation de la nomenclature bimodale M1 vs. M2 (Allavena & Mantovani 2012) dans le contexte de la neuro-inflammation des LDP de la moelle épinière et des lésions corticales de la SEP. Nous sommes néanmoins convaincus qu'une telle classification est trop restrictive et qu'elle ne peut pas refléter l'ensemble des profils moléculaires que les macrophages/cellules microgliales sont capables d'adopter. En effet, si pour certains auteurs, une activation aiguë des macrophages/cellules microgliales conduirait à leur polarisation de type M1 alors qu'une activation chronique conduirait à un phénotype de type M2 (Ajmone-Cat *et al.* 2013), nous avons montré dans notre étude, la présence concomitante de marqueurs de type M1 et M2 dans certains profils d'activation chronique.

Ainsi, on peut se demander si les différents marqueurs d'activation constituent un programme commun au sein d'une cellule (comme on l'observe dans des plaques SEP) (Vogel *et al.* 2013) ou bien si plusieurs populations cellulaires de polarisation distinctes coexistent. Au sein même de la dichotomie M1/M2, il est connu qu'un programme d'activation n'est pas définitif, ni dans le temps ni dans l'espace ; ceci donnant plus de souplesse à cette nomenclature. En particulier, une cellule pourrait changer de phénotype selon son micro-environnement, caractérisé par le stade de la maladie et la localisation des lésions (Caras *et al.* 2011). Par exemple, un gradient est observé dans les modèles de la SLA, entre les régions cervicales et lombaires de la moelle épinière, allant de profils neuro-protecteurs à neuro-toxiques (Beers *et al.* 2012; Liao *et al.* 2012). La recherche de programmes d'activation plus fins s'inscrit donc dans une démarche d'amélioration de la nomenclature utilisée, entamée par de nombreux auteurs (Mantovani *et al.* 2004; Colton & Wilcock 2010; Perry 2010; Perry *et al.* 2010; Ajmone-Cat *et al.* 2013). Afin que ce concept soit pertinent sur le plan clinique et physiopathologique, il nous faut trouver des marqueurs moléculaires plus fins afin de décrire le continuum et la dynamique d'inter-conversion existant entre les profils M1 et M2.

L'analyse des données transcriptomiques

La qualité des puces d'expression s'est considérablement améliorée depuis leurs premières utilisations en 1995. Le bruit de fond a diminué et les mesures en sont d'autant plus fiables. Malgré cela, les résultats issus d'analyses transcriptomiques sont souvent décevants et parfois controversés (Tan 2003). La difficulté d'analyse réside dans le déséquilibre dimensionnel impressionnant entre le nombre de patients (relativement peu élevé : 8 à 118 pour ce travail de thèse) et le nombre immense de gènes analysés (environ 50 000) (Jordan 2010). Même s'il est vrai qu'une petite moitié des gènes seulement dépassent le seuil de détection, le nombre de gènes restent trop important pour être analysé manuellement par les techniques de biologie traditionnelles. Par ailleurs, le fait que seule une moitié des gènes, en moyenne, soit détectable pose question quant à la sensibilité de cette technologie. En particulier, qu'en est-il des gènes dont l'expression est faible de façon globale ou parce que restreinte à une sous-population cellulaire minoritaire ?

Les gènes différentiellement exprimés entre deux groupes sont identifiés en utilisant des tests statistiques d'hypothèses. En effet, ces tests sont basés sur un paradigme qui consiste à rejeter l'hypothèse d'égalité, alors que nous sommes justement en train de construire des hypothèses. Des seuils arbitraires, comme le trop bien connu « 5% », sont fixés pour sélectionner des gènes dont on ne connaît pas forcément la signification biologique. Pour pallier ce problème, nous avons élaboré plusieurs stratégies. D'une part, nous avons utilisé les seuils statistiques afin d'analyser des listes de gènes restreintes dans la limite du possible, que ce soit le 5% du test de Wilcoxon ou le Delta de l'analyse SAM, ou encore les 100 gènes les plus corrélés à *IBA-1*. D'autre part, c'est l'analyse secondaire qui nous a paru la plus importante : enrichissement, analyse bibliographique et confirmation moléculaire et histologique. De plus, pour identifier les gènes différentiellement exprimés dans les LDP par rapport aux SBAN adjacentes, nous avons confronté les résultats de deux approches (SAM et test de Wilcoxon) et vérifié la présence commune de gènes clés attendus comme étant différentiellement exprimés (type MBP, MOG...). Et enfin, dans notre approche de microdissection virtuelle, nous avons choisi de nous intéresser aux variations communes et non aux valeurs absolues d'expression.

Un défaut de l'analyse de nos jeux de données est l'absence de « validation statistique » des modèles observés. Prenons l'exemple de l'analyse transcriptomique des LDP. Quelle que soit l'analyse statistique utilisée (ACP : analyse par composantes principales, SAM et tests de Wilcoxon), des profils d'expression permettent de distinguer nos deux groupes d'échantillons (LDP vs. SBAN). Le seul moyen de valider nos observations serait d'appliquer les mêmes analyses à un second jeu de données obtenu de la même façon mais complètement indépendant et d'obtenir les

mêmes résultats (Tan 2003; Ein-Dor *et al.* 2006; Venet *et al.* 2011). Cette validation apporterait une force supplémentaire à nos observations.

De l'application de la microdissection virtuelle aux LDP

La suite logique de nos deux études fût d'appliquer la méthode de microdissection virtuelle aux données transcriptomiques des LDP. Nous nous sommes empressés de la tester et avons très vite été confrontés à une contrainte inhérente à nos données transcriptomiques. En effet, bien que les échantillons étudiés pour les LDP aient subi les mêmes traitements et protocoles que ceux utilisés par le réseau BrainNet Europe, ils n'ont malheureusement pas été analysés sur les mêmes puces d'expression (Illumina *vs.* Affymetrix). Or, il existe encore des problèmes d'homogénéisation entre ces puces, difficilement comparables entre elles : nomenclature des gènes, référencement des sondes ADN, algorithme de normalisation... (Tan 2003). Un autre écueil rencontré a été le faible niveau d'expression du gène *IBA-1*, qui, sur la majorité de nos échantillons LDP et SBAN, ne dépassait pas le seuil de détection. L'hypothèse d'une faible expression est peu probable étant donné les marquages immunohistochimiques obtenus pour *IBA-1* et nous suspectons davantage une faible efficacité des trois sondes qui le représentent.

Table 1 : Les programmes d'activation macrophagique/microgliale dans les LDP *vs.* SBAN.

ITGAM		CD53	
LDP	SBAN	LDP	SBAN
ARHGDIB	APOL2	CD59	ACTR3
BLNK	AXL	CPM	ADAR
CALM1	B2M	DDX3X	ATM
CDC73	B4GALT1	HDAC2	BAX
COL4A3BP	BTN3A1	IL6ST	C1QB
CXADR	CFL1	INHBA	CCR1
CYBB	CRCP	KLF6	CD14
FNIP1	ETS1	LGALS3	CD59
HIST1H4H	EXOSC6	LRBA	CREB1
ILF3	FCGR3B	MSN	CTNNA1
MYO1C	FYB	NFX1	CTSS
NCOR1	HIF1A	SEC24A	CYBA
NMI	HLA-DOA	STAT3	CYBB
PCBP2	HLA-DPA1	TAX1BP1	CYLD
RAC1	HLA-DRB1	TGFBR3	ESRRA
TGFBR2	HLA-DRB4	THEMIS2	FCGR1A
	HLA-F	VPS54	GIMAP1
	HNRNPA0	YWAB	HMGB1
	IL13RA1		HNRNPA0
	ITGB2		IFI16
	OAS1		LYN
	PAG1		NFATC2
	PTPRC		PTPRJ
	PXK		RNF135
	RBM15		SAMHD1
	SAMSN1		SERPINA1
	SPG21		SRPK2
	TLR3		TRIM38
	TNFRSF14		VAV1
	YTHDF2		

Chaque colonne présente la liste de gènes corrélés à ITGAM ou CD53 au sein des échantillons de LDP ou de SBAN. Seuls les gènes immunitaires sélectionnés d'après leurs termes GO (gene ontology) associés avec le logiciel TargetMine sont présentés ici. Les noms de symboles des gènes sont utilisés.

Nous avons donc recherché d'autres gènes de référence macrophagique/microgliale potentiels. *CD68*, un marqueur d'activation macrophagique/microgliale, ne dépasse le seuil de détection que dans les échantillons de LDP, ce qui est biologiquement plausible. En effet, ce marqueur est sans doute surexprimé dans les zones de périplaques où l'on observe une accumulation macrophagique/microgliale. Néanmoins, il ne pouvait pas être utilisé pour comparer la réponse observée dans les LDP à celle observée dans la SBAN. *CD14* et *Glut-5* présentaient les qualités requises mais sont trop associés à la polarisation M2 pour que nous les retenions (Malide *et al.* 1998; Foucher *et al.* 2013). Seuls *ITGAM (CD11b)* et *CD53* répondaient à nos conditions qui demandent d'être significativement exprimés sur l'ensemble des échantillons LDP et SBAN (Inoue *et al.* 1999; Boche *et al.* 2013). Nous avons donc comparé les gènes les plus corrélés à *ITGAM* ou à *CD53* dans les LDP et la SBAN adjacente. L'enrichissement en gènes myéloïdes est convaincant. Néanmoins, la proportion de gènes immunitaires est relativement faible (Table 1). Le nombre d'échantillons au sein d'un groupe (8 LDP et 8 SBAN) était alors trop faible pour obtenir des corrélations qui aient suffisamment de sens biologique. De plus, les quantités initiales d'ARN étaient très faibles et il se peut que l'étape de triple amplifications n'ait pas affecté tous les transcrits de la même façon.

Des limites de la microdissection virtuelle appliquées aux données de puces d'expression

Devant ces difficultés, nous nous sommes interrogés sur les limites de la méthode de microdissection virtuelle. Le choix du gène de référence est un point crucial. Certaines études utilisent plusieurs gènes de référence et en déduisent un gène théorique de référence (Kuhn *et al.* 2011). Nous avons préféré en utiliser un seul, *IBA-1*, afin de réellement simplifier la méthode de regroupement. L'expression du gène de référence par un type cellulaire spécifique exclusivement doit être garantie. Par exemple, *CD4* pourrait être intuitivement utilisé comme gène de référence des LT $CD4^+$ mais les macrophages l'expriment également (Lee *et al.* 1999).

Nous ne pensons pas que l'identification des programmes d'activation macrophagique/microgliale ou de tout autre programme cellulaire soit complète par cette méthode et c'est pour cela que nous employons le terme de « signature » moléculaire. En effet, la technologie des puces d'expression restreint la liste des transcrits étudiés par opposition à la nouvelle technique d'analyse transcriptomique (« RNA-seq » pour séquençage d'ARN) qui consiste à séquencer l'ensemble des ARN d'un échantillon via la génération d'ADN complémentaires et de les comparer à un génome de référence (Nagalakshmi *et al.* 2010). Cette technique permet de quantifier le niveau d'expression de chaque ARN mais apporte également des informations d'épissage et de modifications post-

transcriptionnelles. Dans tous les cas, ces techniques s'arrêtent au niveau transcriptionnel et ne tiennent pas compte des régulations traductionnelles de la cellule. De plus, nous avons exclu les transcrits qui n'étaient pas exprimés par l'ensemble des échantillons d'un groupe, ce qui pourrait biaiser nos conclusions. Nous avons maintenu ce choix afin de réduire la variabilité inter-individuelle en gardant des données homogènes au sein d'une pathologie, et pour calculer des corrélations sur des mesures dépassant les seuils de détection. Pour les mêmes raisons, la technique des puces d'expression ne peut pas convenir à des populations cellulaires faiblement représentées dans le tissu entier comme des sous-populations de lymphocytes au sein du SNC. Leur trop petit nombre ne permet pas à leurs gènes spécifiques de passer au-dessus des seuils de détection. Enfin, de nombreux gènes sont exprimés par plusieurs types cellulaires et cette méthode ne permet pas de les discriminer. C'est pour cela qu'il existe des méthodes mathématiques de déconvolution qui considère que la valeur d'expression d'un gène résulte de la combinaison linéaire des valeurs d'expression de ce gène par plusieurs types cellulaires (Abbas *et al.* 2009; Shen-orr *et al.* 2010; Zhao & Simon 2010). Nous n'avons pas pu utiliser ce type de méthode car nous ne pouvions pas déterminer l'abondance des différents types cellulaires.

Tenant compte des limites énoncées ci-dessus, nous avons analysé avec précaution nos résultats. La partie suivante rappelle les résultats majeurs que nous avons obtenus et leur interprétation concernant les programmes d'activation macrophagique/microgliale dans les formes progressives de la SEP.

2) Des résultats : l'activation macrophagique/microgliale dans la SEP...

Pour rappel, nous avons analysé deux types de matériaux différents. La **première étude, histologique et moléculaire**, nous a permis de caractériser la réponse macrophagique/microgliale dans les **LDP de la moelle épinière** des patients SEP atteints de formes progressives. Les échantillons microdisséqués sont extrêmement précis. La **seconde étude** a analysé la réponse macrophagique/microgliale dans le contexte lésionnel général des **lésions corticales**. Les échantillons comprennent à la fois des lésions de démyélinisation et leurs espaces péri-lésionnels.

...au sein des LDP...

Une accumulation de macrophages/cellules microgliales en contact étroit avec les gaines de myéline caractérise principalement les LDP. L'activité phagocytaire y est présente, mais à bas bruit. L'environnement inflammatoire, qui en résulte, est constitué à la fois de signaux pro-inflammatoires et anti-inflammatoires. Il semble spécifique des LDP et suggère la mise en œuvre de processus

inflammatoires chroniques, différents des processus aigus à l'origine des plaques de démyélinisation. Plus précisément, parmi les gènes fortement exprimés au sein des LDP, on retrouve les acteurs majeurs du complément (*C1S*, *C4A*, *C4B*, *C7*), les marqueurs d'activation macrophagique/microgliale (*HLA II*, *CD58*, *CD44*), un marqueur macrophagique de type M2 anti-inflammatoire (*CD163*) (Mantovani *et al.* 2004), des récepteurs aux signaux de danger (*TLR4* et *TLR7*) et des récepteurs de chimiokines fortement impliqués dans le recrutement et l'activation des macrophages/cellules microgliales (*CXCR4* et *CXCR7*) (Tanabe *et al.* 1997; Li & Ransohoff 2008; Man *et al.* 2012). S'ajoutent à ceux-ci trois cytokines importantes — la cytokine anti-inflammatoire IL-27, le facteur de croissance des mastocytes SCF (Stem cell factor) et la cytokine pro-inflammatoire APRIL aussi appelée facteur de croissance et de différenciation des cellules B (Vincent *et al.* 2013; Hirase *et al.* 2013) — et cinq récepteurs de cytokines : le récepteur SEF (*IL17RD*), les récepteur de l'IL-1 β , de l'IL-13, de l'Oncostatine et du TGF- β (*IL1R1*, *IL13RA1*, *OSMR*, *TGFBR3*). Enfin, Les gènes de la signalisation TGF- β mais aussi IFN- γ sont fortement représentés dans les LDP. La coexistence de signaux anti-inflammatoires et pro-inflammatoires n'est pas surprenante. Elle a notamment déjà été décrite au sein même de la SBAN de cerveaux atteints de formes progressives de la SEP (Zeis *et al.* 2008a). Les auteurs suggèrent que l'activité pro-inflammatoire des macrophages/cellules microgliales supporte les altérations diffuses observées dans la SBAN et qu'elle est suffisante pour favoriser l'infiltration de cellules immunitaires périphériques. Au contraire, ils attribuent les signaux anti-inflammatoires aux oligodendrocytes qui participeraient activement à la neuro-protection aux côtés des astrocytes. En ce sens, la signalisation TGF- β est connue pour réduire la démyélinisation et le recrutement des macrophages/cellules microgliales (Drescher *et al.* 2000). Ici, il semble qu'à l'échelle même des macrophages/cellules microgliales, des signaux pro-inflammatoires de type M1 (APRIL, SCF, IFN- γ , IL-1R1) et des signaux anti-inflammatoires de type M2 (IL-27, CD163, IL-13RA1, TGFBR3) coexistent. De tels profils intermédiaires ont été décrits au sein des lésions SEP chroniques (Vogel *et al.* 2013; Fischer *et al.* 2013b).

De plus, les LDP sont caractérisées par une perte lente et progressive de la myéline en présence de fines altérations astrocytaires et oligodendrocytaires. En cela, elles sont différentes des plaques de démyélinisation, un processus connu pour être aigu et relativement rapide. Si ces deux structures sont indéniablement liées dans l'espace, elles pourraient évoluer indépendamment dans le temps. Nous pensons que **la réponse macrophagique/microgliale observée contribue en partie à perpétuer, voir étendre, la démyélinisation des LDP et empêcher leur remyélinisation en établissant un dialogue particulier avec les autres cellules gliales présentes** (Fig. 1).

Naturellement, cette activation macrophagique/microgliale n'est, pour l'instant, observée que dans les LDP des lésions de la moelle épinière dans des formes progressives tardives. Elle

pourrait être similaire dans le cerveau mais cette mise en évidence nous rappelle la complexité de la réponse macrophagique/microgliale dans un tissu et il serait utopique de vouloir identifier « le » profil d'activation spécifique de la SEP. D'ailleurs, notre seconde étude s'est intéressée à des lésions corticales de formes progressives similaires et ne met pas évidence les mêmes signatures macrophagiques/microgliales.

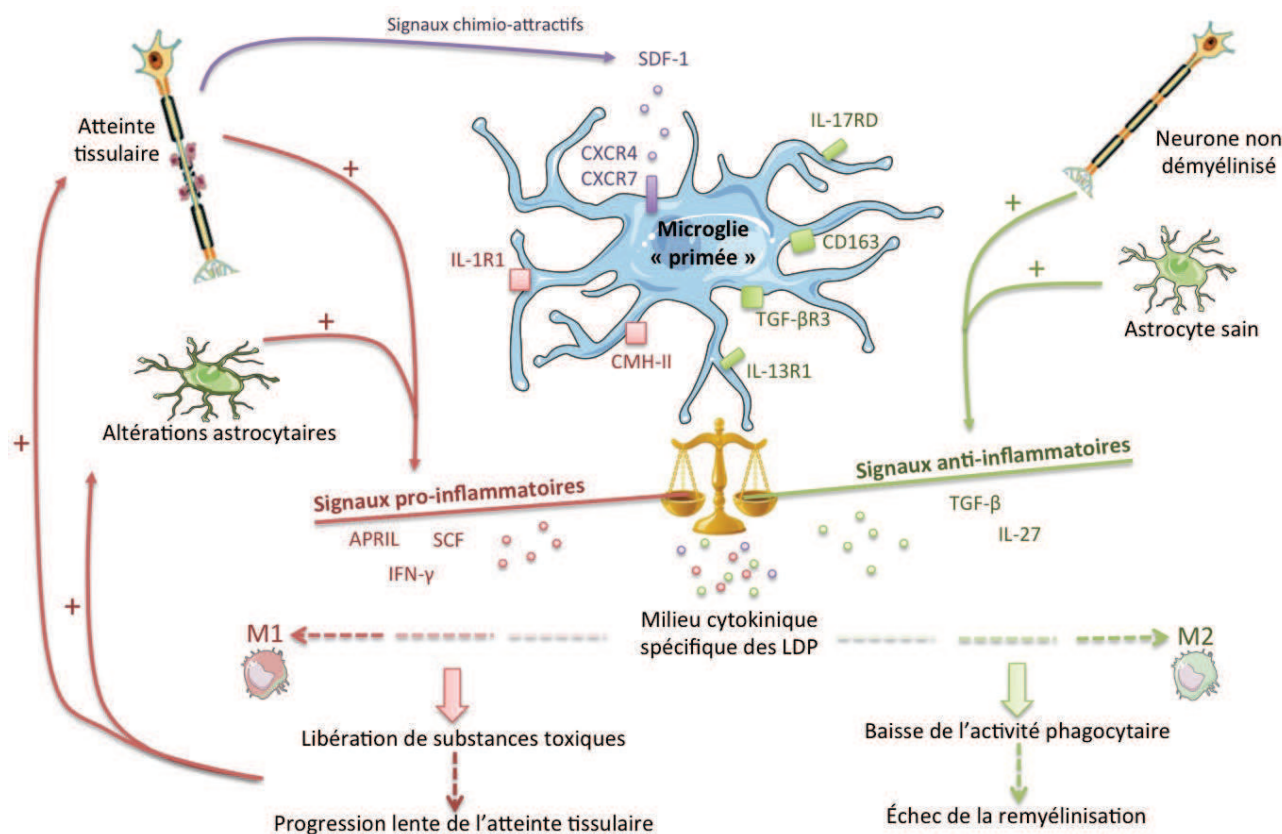


Figure 1 : Comment les macrophages/cellules microgliales participent à la démyélinisation chronique des LDP ? Représentation hypothétique des LDP. Les LDP sont caractérisées par la création d'un microenvironnement particulier où les signaux pro- et anti-inflammatoires sont proches de l'équilibre. L'atteinte tissulaire entretient l'activation chronique des macrophages/cellules microgliales qui contribuent alors à l'atteinte tissulaire à bas bruit.

... et au sein des lésions corticales

Notre seconde étude a, d'une part, confirmé l'activation macrophagique/microgliale, et d'autre part, mis en évidence une signature particulière de cette activation dans le contexte des **lésions corticales** de la SEP (Fig. 2).

En effet, les marqueurs d'activation « classiques » sont corrélés au profil d'expression d'*IBA-1* chez les patients analysés : *CD74*, *HLA-II* et *CD68*. Le profil d'activation macrophagique/microgliale associé aux lésions corticales de la SEP inclut des gènes impliqués dans les fonctions de l'immunité innée habituellement attribuées aux macrophages/cellules microgliales : présentation antigénique, phagocytose, synthèse de chimiokines et cytokines, transduction de leur signal, reconnaissance des signaux de danger, activation et régulation du système du complément.

En comparant ce profil mis en évidence pour la SEP à celui de **cinq autres pathologies du SNC à composantes neuro-dégénératives**, nous avons identifié un **socle commun d'activation macrophagique/microgliale** comme on le supposait déjà depuis de nombreuses années (Fig. 2) (Lucin & Wyss-Coray 2009; Perry *et al.* 2010; Cunningham 2013). Il est constitué de gènes impliqués dans la **présentation antigénique** (*CD74*, *HLA*), le **système du complément** (*C1Q*, *C3*), la **transduction du signal dans les cellules myéloïdes** (*BTK*, *WASP*, *DAP10*, *DAP12*), la **formation de l'inflammasome** (*PYCARD*) et la **génération d'ions superoxyde** (*NOX2*). On retrouve également les marqueurs macrophagiques/microgliaux utilisés habituellement (*CD14*, *CD68*, *GLUT5*) et des gènes dont les fonctions immunitaires ne sont pas encore décrites (*APOC2*, *CENTA2*, *ARHGDIB*, *GPR92*, *S100A11*). Des molécules clés seraient donc impliquées dans des programmes d'activation macrophagique/microgliale bien distincts et pourraient être utilisées comme de **nouveaux marqueurs**. Elles pourraient aussi être considérées comme des **cibles thérapeutiques potentielles**, notamment les gènes pro-inflammatoires comme *NOX2* ou *PYCARD*. De la famille des NADPH oxydases, *NOX2* est une enzyme impliquée dans l'activité phagocytaire conduisant non seulement à la production d'espèces réactives de l'oxygène mais aussi à l'activation de protéases (Sorice & Krause 2009), à la modulation des capacités migratoires des macrophages/cellules microgliales (Lelli *et al.* 2013) et de leurs activités neurotoxiques (Sorice & Krause 2009; Wang *et al.* 2013). *PYCARD* est un composant de l'inflammasome : un complexe protéique directement induit par les signaux infectieux ou d'atteintes tissulaires reçus par les macrophages/cellules microgliales et conduisant à une seconde vague de production de signaux pro-inflammatoires (Ransohoff & Brown 2012).

Plus intéressant encore, nous avons mis en évidence une véritable **signature du programme d'activation macrophagique/microgliale spécifique des lésions corticales de la SEP** (Fig. 2). Les gènes identifiés comme spécifiques de la réponse « SEP » nous ont surpris par la richesse des interprétations biologiques possibles : *CKLF*, *CTS2*, *DOCK11*, *EMILIN2*, *FOLR2*, *HLA-E*, *IRF-1*, *PRSS23*, *RGS1*, *SPP1*, *TNFRSF1B*, *TNFSF5IP1*. Quatre d'entre eux — *RGS1*, *HLA-E*, *IRF-1* and *SPP1* — avaient déjà été invoqués dans la compréhension de la SEP, ce qui nous confortait dans notre démarche scientifique avant de pouvoir dévoiler de nouveaux gènes impliqués dans la physiopathologie de la SEP.

RGS1 est un facteur de susceptibilité génétique de la SEP récemment mis en évidence dans une étude du consortium international de génétique de la SEP (IMSGC). Cette étude a placé trois nouveaux *loci* de susceptibilité au côté du classique *HLA-DRB1* (*RGS1*, *IL12A* et *CDK2API*) (Habek *et al.* 2010; IMSGC 2010). *HLA-DRB1*, allèle du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II, est le locus de prédisposition génétique de la SEP le plus fortement lié

(Ramagopalan *et al.* 2009). L'association entre la présentation antigénique (CMH-II) et le risque de développer la SEP a longtemps soutenu l'hypothèse auto-immunitaire. Aujourd'hui, il est admis que la région génétique du CMH est en interaction avec d'autres gènes qui pourraient expliquer la réponse inflammatoire dérégulée (Patsopoulos *et al.* 2013). RGS1 est un inhibiteur de la signalisation protéine G induite par des chimiokines qui régule la migration des cellules immunes comme les lymphocytes (Tran *et al.* 2010). Il est donc plausible que RGS1 soit impliqué dans le degré de sévérité des attaques de SEP (Mowry *et al.* 2013).

HLA-E est une molécule non conventionnelle du CMH de classe I qui est fortement exprimée au sein des lésions actives de SEP (Durrenberger *et al.* 2012). Elle présente des peptides et interagit avec le complexe CD94/NKG2 porté par les cellules Natural Killers (NK) et certains lymphocytes T (LT) CD8⁺ cytotoxiques. Il a été montré que des formes solubles de HLA-E sont produites par les macrophages infiltrant des tumeurs, notamment les glioblastomes (Kren *et al.* 2010). Cette forme soluble augmente dans le sérum et le LCR de patients atteints de formes rémittentes de la SEP (Morandi *et al.* 2013). Chez les patients SEP, elle serait exprimée non seulement par les macrophages et cellules microgliales résidentes mais aussi par les lymphocytes et les astrocytes. La synthèse intra-thécale de HLA-E soluble refléterait un stress cellulaire généralisé et serait corrélée à la durée de la maladie (Morandi *et al.* 2013). En effet, HLA-E pourrait jouer un rôle protecteur via l'activation de LT CD8⁺ régulateurs (Correale & Villa 2008; Niederkorn 2008; Durrenberger *et al.* 2012; Pannemans *et al.* 2013).

IRF-1 est un facteur de transcription immuno-modulateur clé, induit notamment dans les situations de démyélinisation et d'atteintes oligodendrocytaires (Ren *et al.* 2010; Loda & Balabanov 2012). Les souris déficientes pour le gène *IRF1* ne développent pas d'EAE, suggérant son rôle délétère (Tada *et al.* 1997). En effet, il favoriserait la production de facteurs pro-inflammatoires et pro-apoptotiques dans le SNC. Sa forte expression suggère une activation perpétuelle, appelée état « primé », des macrophages/cellules microgliales encore plus sensibles aux stimulations ultérieures (Cunningham 2013). Comme HLA-E soluble, IRF-1 pourrait être utilisé comme biomarqueur de l'inflammation chez les patients SEP.

Enfin, l'Ostéopontine (**SPP1**) augmente anormalement dans le sang et le LCR des patients SEP, et ce de façon plus prononcée lors des poussées (Vogt *et al.* 2010; Börnsen *et al.* 2011). Elle est exprimée en particulier par les macrophages à la suite d'épisodes de démyélinisation (Chiocchetti *et al.* 2005; Zhao *et al.* 2008). Il s'agit d'une protéine de la matrice extra-cellulaire sécrétée par les neurones en conditions physiologiques. Sa synthèse accrue au cours de la SEP serait corrélée aux épisodes inflammatoires et pourrait être un marqueur de l'altération neuronale (Börnsen *et al.* 2011). Néanmoins, dans les modèles de SEP, son rôle reste incertain dans les

processus de démyélinisation ou de remyélinisation, ce qui en fait une cible thérapeutique controversée.

Parmi les autres gènes spécifiques de la SEP que nous avons mis en évidence dans les lésions corticales, un facteur sécrété et deux récepteurs ont retenu notre attention : la molécule chimio-attractante des cellules myéloïdes *CKLF* (chemokine-like factor), le récepteur au TNF- α de type 2 *TNFRSF1B* et le récepteur folate *FOLR2*. Ces trois gènes n'ont pas encore été montrés comme directement impliqués dans la SEP. Ils constituent donc trois nouveaux biomarqueurs potentiels.

FOLR2 est un marqueur de type M2 des macrophages associés aux tumeurs (Puig-Kröger *et al.* 2009). Néanmoins, si l'on tient compte de l'ensemble du profil macrophagique/microgliale mis en évidence, il dépasse largement la balance M1 vs. M2. En effet, le profil révélé ici, apparait spécifique des lésions corticales de la SEP, dans le cadre restreint d'une inflammation chronique qui perdure déjà depuis plusieurs années. Le caractère de ce profil n'est pas strictement pro-inflammatoire comme celui connu pour les lésions actives de la SEP. Les macrophages/cellules microgliales, ayant probablement reçu un signal d'activation précoce, semblent incapables de revenir à leur état initial et maintiennent un état inflammatoire où les cellules sont qualifiées d'« activées » d'après les marqueurs utilisés habituellement (HLA, CD68...).

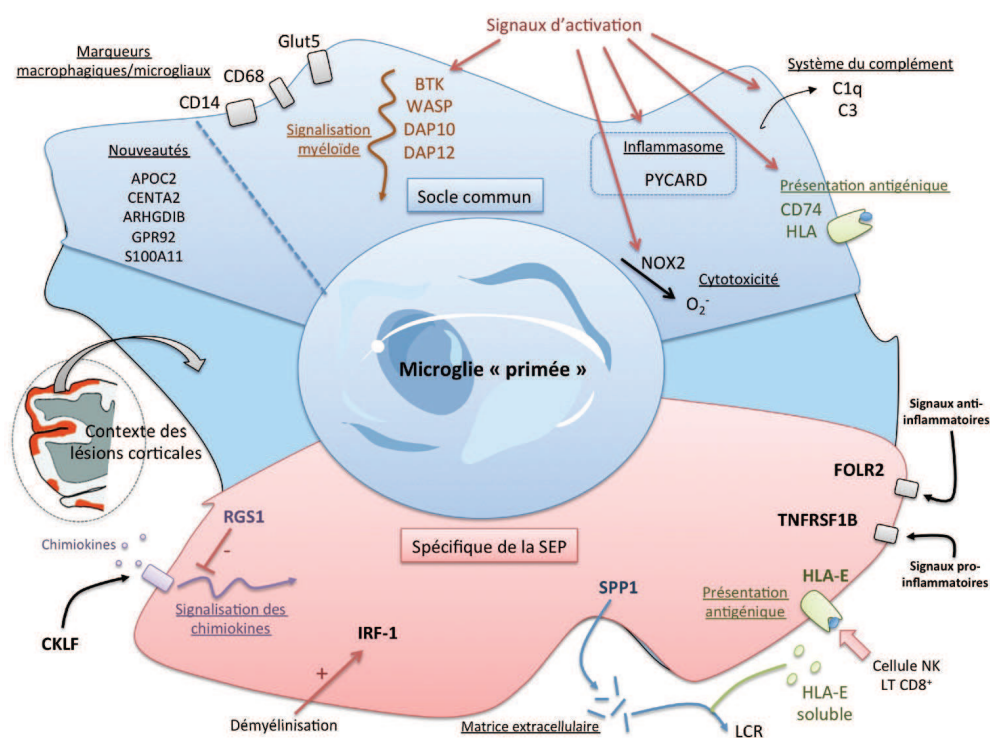


Figure 2 : Profil d'activation macrophagique/microgliale dans le contexte inflammatoire des lésions corticales de la SEP. Les molécules indiquées sont issues des signatures moléculaires des programmes d'activation macrophagique/microgliale identifiées dans la deuxième étude. La partie supérieure correspond à la signature commune à la SEP et aux cinq autres pathologies. La partie inférieure est spécifique des lésions corticales de la SEP.

Une activation rémanente commune aux LDP et aux lésions corticales : la notion de « priming »

Que ce soit dans les lésions corticales ou bien dans les lésions LDP de la moelle épinière, les macrophages/cellules microgliales étudiées nous ont apparu « activés » comme le veut la norme dans ce domaine, c'est-à-dire présentant des marqueurs d'activation moléculaire. Pourtant, leur activité phagocytaire et cytotoxique est apparue bien peu marquée dans les LDP, suggérant que la balance inflammatoire entre des signaux pro- et anti-inflammatoires s'y équilibre. Les macrophages/cellules microgliales ayant reçu les signaux pro-inflammatoires des plaques adjacentes au cours des phases de démyélinisation aiguë, semblent également présenter un état d'activation intermédiaire que certains auteurs qualifient d'« état primé » (Cunningham 2013). Ce concept de « priming » suggère que les cellules répondraient bien plus intensément lors des stimulations suivantes. Dans notre étude, il semble que ce soit cet « état primé » qui participe au maintien d'une inflammation minimale dans les LDP et probablement dans les tissus corticaux.

Rappelons ici que les patients SEP, analysés pour leurs lésions médullaires ou corticales, ont souffert d'une longue phase progressive. Durant la phase progressive, le handicap des patients s'accumule et les processus réparateurs semblent inefficaces. Dans les LDP, nous émettons l'hypothèse que la réponse macrophagique/microgliale mise en évidence contribue à l'atteinte tissulaire drastique observée dans la moelle épinière. C'est sans doute aussi le cas dans les lésions corticales. Ayant étudié des stades tardifs de la maladie, nous sommes conscients que les profils macrophagiques/microgliaux observés ne sont pas représentatifs de l'initiation d'une lésion mais bien du **maintien d'une inflammation chronique** pendant de longues années. Les cellules auraient gardé une mémoire moléculaire des signaux activateurs/désactivateurs successifs précédents, mémoire qui affecterait leur capacité à répondre aux nouvelles stimulations, comme suggéré par certains auteurs (Perry 2010; Ajmone-Cat *et al.* 2013). Cette mémoire des cellules microgliales est qualifiée de « priming » (pré-conditionnement) par ces auteurs qui voient dans le profil d'activation intermédiaire entre le stade quiescent et activé, un témoin du passé plutôt que de l'avenir (Perry 2010; Cunningham 2013). Pour ces auteurs, les macrophages/cellules microgliales « primés » sont prêts à répondre rapidement à de nouveaux signaux de danger, liés à la démyélinisation comme à l'atteinte neuronale, et ne reviennent jamais à l'état initial quiescent. Il s'agirait d'une sorte de **phénotype agressif latent**, maintenu au fil des années, comme un **état cicatriciel jamais résorbé** (Perry 2010; Netea *et al.* 2011). Si l'on adopte cette hypothèse, les macrophages/cellules microgliales seraient loin de n'être que des éboueurs autour des lésions corticales ou de la moelle épinière (Barnett *et al.* 2006) : l'activation macrophagique/microgliale « primée » dans les SEP progressives pourrait être le véritable support cellulaire de l'évolution de la maladie, étant donné

l'impact des lésions corticales et des lésions de la moelle épinière sur l'atteinte neurologique progressive et irréversible des patients.

Enfin, et quelle que soit la nomenclature utilisée pour désigner les pourtour des lésions, l'état cellulaire « primé » des macrophages/cellules microgliales pourrait participer au **maintien d'un milieu cytokinique** contribuant à l'extension des lésions (Merson *et al.* 2010). Nos études démontrent à la fois la production et la réception de signaux divers, témoins du **dialogue spécifique qui s'établit avec les autres cellules gliales et neuronales présentes**. Par exemple, IL-27, SCF et APRIL forment un cocktail cytokinique dans les LDP, et des traces des signalisations IL-1 β , IL-17, IL-13, Oncostatine, IFN- γ , TGF- β et SDF-1 y sont mesurées (Fig. 1). Les macrophages/cellules microgliales ne sont évidemment pas les seuls contributeurs à ce microenvironnement. En effet, le profil transcriptomique neuronal observé dans les lésions corticales est particulièrement enrichi dans les voies de signalisation des leptines, des androgènes et des cytokines anti-inflammatoires IL-4 et IL-13. Ce programme d'activation neuronal pourrait participer à la prévention des dysfonctionnements neuronaux autour des lésions corticales.

Une plasticité d'activation à l'origine des signatures moléculaires spécifiques de chaque pathologie neurodégénérative

Comme nous venons de le décrire, les profils d'activation observés pour les macrophages/cellules microgliales diffèrent entre les LDP et les lésions corticales. Par ailleurs, nos résultats mettent en évidence la spécificité des profils selon les pathologies du SNC étudiées. Nos études démontrent donc la grande plasticité moléculaire des macrophages/cellules microgliales activées, plasticité suspectée depuis longtemps mais non encore formellement démontrée (Ransohoff & Perry 2009; Perry 2010; Perry *et al.* 2010). Ainsi, lors d'atteintes neuronales, il semblerait que le microenvironnement qui en résulte soit spécifique de la région lésée et de la pathologie.

S'il nous reste encore à préciser la nature de ces signatures d'activation et à comprendre si elles contribuent à, ou reflètent de simples différences d'atteintes cellulaires, notre travail démontre le caractère spécifique de certains mécanismes cellulaires. Citons, par exemple, le plus fort enrichissement en gènes de la **présentation antigénique** et du **système du complément** dans le profil de la **maladie d'Alzheimer** plutôt que dans celui de la SEP, soulignant l'importance des mécanismes de **l'immunité innée** et des CPA dans la physiopathologie de cette maladie. Ensuite, si l'on compare le profil de la SEP à celui de la SLA, la forte représentation de gènes du

chimiotactisme et de la signalisation cytokinique des LT dans la SLA est étonnante et attribuerait un rôle majeur aux **LT infiltrants** dans la physiopathologie de la SLA comme le suggèrent, d'ailleurs, quelques études (Rentzos *et al.* 2012). La SLA étant la maladie la plus sévère des six étudiées, ou du moins évoluant le plus rapidement, cette forte représentation pourrait être un effet de la « condensation » des événements dans le temps qui sont davantage « dilués » dans les maladies à progression lente. Enfin, la **schizophrénie** se caractérise par un milieu cytokinique riche, incluant des cytokines classiques (IL-1 β , TGF- β 1 et IL10) aux côtés de neuro-modulateurs (MIF, Histamine et Cholecystokinine). Plusieurs études ont montré les variations plasmatiques en **cytokines** (Xu & He 2010; Miller *et al.* 2011; Fatjó-Vilas *et al.* 2012) et le rôle des neuro-immunomodulateurs dans cette atteinte (Arrang 2007; LaCrosse & Olive 2013).

Implications cliniques et directions futures

Si des études mécanistiques ultérieures sont requises pour expliquer les mécanismes moléculaires mis en jeu, les résultats présentés dans ce manuscrit offrent déjà des **cibles thérapeutiques** à considérer sérieusement. Nous discutons plus loin les perspectives thérapeutiques ouvertes par nos analyses des lésions de LDP. Ici, intéressons-nous plus particulièrement aux thérapeutiques ciblant les macrophages/cellules microgliales. En effet, les profils spécifiques révélés soulignent l'importance de développer des stratégies thérapeutiques ciblant une réponse macrophagique/ microgliale parmi d'autres. Les cibles thérapeutiques sont aussi à considérer comme des marqueurs diagnostic et/ou pronostic de la maladie. Citons comme cibles potentielles : l'Ostéopontine, le récepteur Folate 2 et le CKLF pour la **SEP** ; l'Angiopoïétine 1 ou le PSME1 pour la **maladie d'Alzheimer** ; la Granuline ou la Cathepsine D pour la **SLA** ; le facteur de biogénèse peroxisomale 13, CD300A et BAFF pour la **maladie de Parkinson** ; STAT1 et PSME4 pour la **maladie de Huntington** et l'Adiponectine, IL1- β , IL-10RA et TGF- β pour la **schizophrénie** (Fig. 5). Néanmoins, les cellules microgliales restent difficilement accessibles. Cibler les macrophages infiltrants avant qu'ils ne pénètrent dans le SNC pourrait être une solution. D'ailleurs, on peut se demander s'il existe une **signature précoce** de ces programmes d'activation macrophagique/microgliale dans les **précurseurs sanguins des macrophages** qui pourraient être ciblés directement car plus facilement accessibles. Cette hypothèse s'appuie sur des observations faites dans notre laboratoire. En effet, des macrophages en culture issus de monocytes circulants de patients atteints de formes progressives de la SEP ne présentent pas le même profil d'expression que les macrophages issus de monocytes de sujets sains. Parmi les différences, on retrouve des gènes de réponse aux interférons dont IRF-1 que nous avons trouvé spécifique des lésions corticales de la SEP. Une signature précoce des programmes d'activation macrophagique/microgliale pourrait,

soit témoigner de l'influence des signaux du SNC en détresse sur la périphérie, soit refléter une anomalie du système immunitaire spécifique de la pathologie et précédant l'atteinte du SNC.

Une autre solution peut être d'induire ou de **favoriser le changement des profils macrophagiques/microgliaux délétères vers des profils protecteurs**, profils qui ont été décrits dans différentes conditions pathologiques dont la SEP (Voss *et al.* 2012; Rawji & Yong 2013; Cao & He 2013). En effet, des profils protecteurs, dits « M2 », retrouvés au sein de lésions chroniques actives, semblent favoriser la différenciation oligodendrocytaire et par conséquent promouvoir la remyélinisation (Mikita *et al.* 2011; Olah *et al.* 2012; Sloka *et al.* 2013; Miron *et al.* 2013).

Sur un plan plus fondamental, une meilleure connaissance des programmes d'activation macrophagique/microgliale devrait nous permettre de **générer des cellules microgliales humaines** à partir de précurseurs cellulaires comme certains laboratoires essaient de le faire (Saijo & Glass 2011). Ainsi, nous pourrions étudier *in vitro* le comportement cellulaire des cellules microgliales humaines, ce qui est actuellement difficile. En attendant, nous pouvons utiliser des modèles cellulaires plus éloignés, par exemple des cultures primaires de cellules microgliales à partir de nouveaux nés de rat ou de souris. Des techniques de tri cellulaire permettent aujourd'hui de trier les cellules microgliales à partir de cerveau adulte mais elles doivent être encore améliorées. Les macrophages issus des monocytes circulants sont facilement cultivés. Ils pourraient être utilisés pour transférer des gènes d'intérêt comme ceux identifiés dans nos études et étudier la réponse macrophagique (phagocytose, présentation antigénique, motilité, production neurotoxique). De plus, l'approche *in silico* utilisée a également généré des profils d'expression des astrocytes, des oligodendrocytes et des neurones. Une analyse plus approfondie de ces données mettra en évidence de nouvelles interactions cellules gliales – neurones que nous pourrions tester dans des modèles de co-culture.

B. De la dynamique des plaques

1) Plaque et PDL, quelle histoire ?!

Un des mystères insolubles de la SEP est la compréhension **des mécanismes de formation des plaques de démyélinisation et leur progression**. Une fois la plaque formée, on parvient à peu près à expliquer comment la démyélinisation est entretenue au sein d'une plaque grâce à la connaissance des mécanismes de phagocytose et de cytotoxicité médiés par les différentes cellules de l'immunité et du SNC. Par contre, on ne sait pas réellement comment les lésions sont initiées, pourquoi certaines s'arrêtent et d'autres progressent, ou pourquoi de nouvelles lésions apparaissent.

Notre étude histologique et moléculaire des LDP nous a révélé l'ampleur de l'atteinte tissulaire de la moelle épinière des patients SEP atteints de formes progressives. Les LDP sont constituées de larges zones partiellement démyélinisées qui ne sont pas limitées aux simples contours des plaques de démyélinisation mais qui s'étendent parfois à distance. Leur fréquence élevée nous a conduits à nous interroger sur l'origine des altérations observées. Nous nous sommes demandés **où placer les LDP dans l'évolution des plaques ?** En effet, les LDP de la moelle épinière, de part leur taille, leur forme et la nature du milieu inflammatoire, semblent différer des plaques de démyélinisation. Si elles y sont indéniablement liées dans l'espace, elles pourraient évoluer indépendamment dans le temps. Nos résultats ont montré que les LDP pourraient constituer **un compartiment lésionnel à part entière** où s'établit un dialogue intercellulaire spécifique.

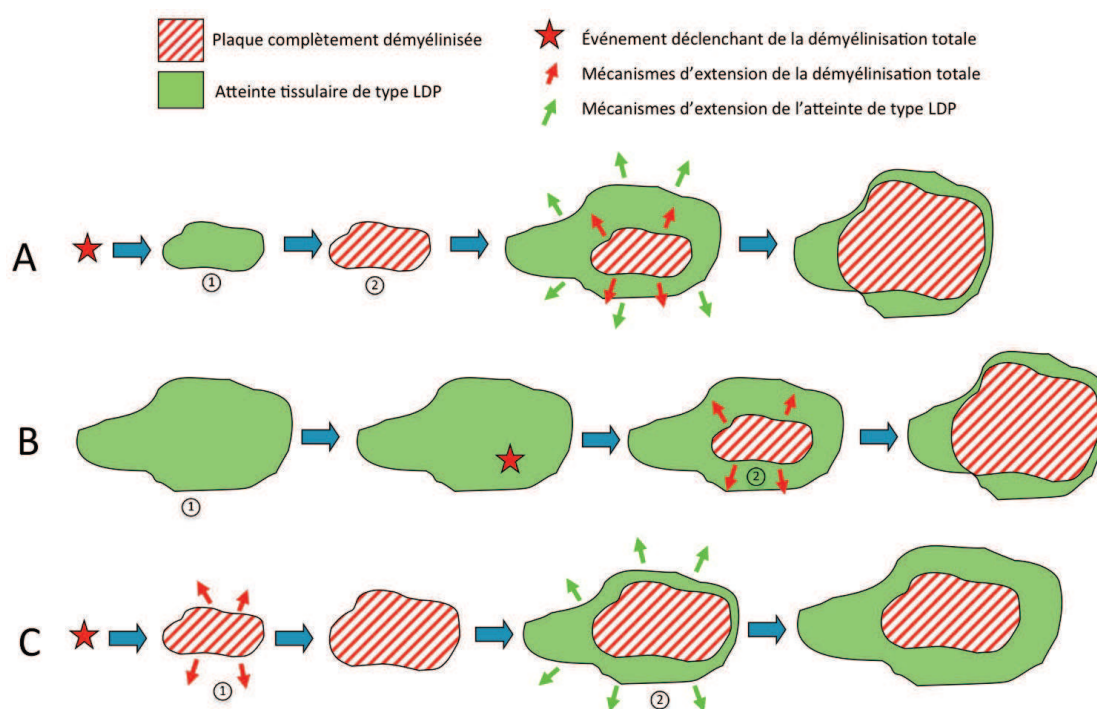


Figure 3 : Trois hypothèses de formation des LDP.

La figure 3 propose les séquences spatio-temporelles qui pourraient expliquer le développement, conjoint ou différé dans le temps, des altérations observées dans les LDP et de celles des plaques complètement démyélinisées. Selon l'hypothèse A (H_A), les altérations tissulaires observées dans les LDP constitueraient **un stade précoce de la démyélinisation totale**. De telles altérations pourraient donc être observées avant l'apparition de zones complètement démyélinisées et autour de celles-ci. Selon l'hypothèse B (H_B), les altérations tissulaires observées dans les LDP apparaîtraient également avant la formation de zones complètement démyélinisées. Il pourrait s'agir d'**une atteinte primitive tissulaire diffuse**, plus prononcée que dans la SBAN et la SGAN, et nécessaire ou suffisante pour induire la formation des plaques de démyélinisation. Selon l'hypothèse C (H_C), la vision classique de formation des plaques de démyélinisation, déclenchée par

un événement inconnu, est conservée. L'atténuation des mécanismes aigus de propagation des plaques conduirait à **une forme chronique d'extension des plaques**, à l'origine des altérations observées dans les LDP. La propagation des LDP serait alors plus ou moins décalée dans le temps par rapport à la formation des plaques. Nous verrons comment nos résultats soutiennent majoritairement cette dernière hypothèse.

2) Comment les lésions SEP sont-elles initiées ?

L'hypothèse vasculaire

Les hypothèses de formation des plaques de démyélinisation sont nombreuses dans la littérature. Nous avons vu, dans la partie bibliographique, que la vision classique des lésions est basée sur l'hypothèse vasculaire. Selon elle, l'inflammation et l'activation de la réponse auto-immune périphérique expliqueraient les altérations de la BHE, puis l'entrée massive de cellules immunes dans le SNC et la formation d'une plaque via l'activation des cellules microgliales résidentes.

Des arguments continuent d'alimenter cette hypothèse. Des protéines plasmatiques solubles, comme le fibrinogène, pénétrant dans le SNC ou par simple dépôt sur les parois des capillaires, suffiraient à induire l'activation des cellules microgliales avant le début de la démyélinisation (Davalos *et al.* 2012). La zone d'activation des cellules microgliales démarquerait l'aire d'une nouvelle lésion (Marik *et al.* 2007; Davalos *et al.* 2012), ce qui serait compatible avec l'hypothèse H_A. Elles amplifieraient ensuite les altérations des barrières et activeraient une réponse immunitaire spécifiquement dirigée contre le SNC suite à la libération d'antigènes. Dans nos observations, l'activation des cellules microgliales par un agent extérieur est suggérée par la formation des nodules microgliaux au sein des LDP. En effet, de tels regroupements de cellules microgliales sont le plus souvent observés dans les infections virales, dans la SEP et rarement dans les pathologies neuro-dégénératives (Kato *et al.* 1987; Nebuloni *et al.* 2000; Barnett *et al.* 2009a). Il a été montré, dans notre laboratoire, que certaines cytokines, comme IL-29, connue dans la réponse anti-virale, sont capables d'induire la formation de nodules sur des cultures de macrophages dérivés de monocytes humains.

Quelle que soit l'hypothèse de formation des LDP, il est possible que les altérations de la BHE contribuent à la formation des lésions. Toutefois, au sein des LDP, nous n'avons pas noté d'altérations flagrantes de la BHE au niveau moléculaire. Dans les hypothèses H_B et surtout H_A, on pourrait s'attendre à mettre en évidence de telles altérations au sein des LDP puisque la démyélinisation complète s'y développe. Au contraire, le fait de ne pas observer d'altérations de la BHE suggère que l'inflammation des LDP évoluerait indépendamment de celle des plaques. Il est

d'ailleurs relativement admis que la BHE soit réparée dans les formes progressives de la SEP, créant ainsi une compartimentation de l'inflammation (Bradl & Lassmann 2009).

Les nodules microgliaux forment-ils des lésions pré-actives ?

Sur les coupes de moelle épinière, nous avons observé la présence de nodules microgliaux relativement fréquents, qui se forment principalement au sein des LDP. Ces regroupements de cellules microgliales activées suggèrent une réponse microgliale particulière. Les nodules microgliaux ont été décrits à proximité des lésions SEP, dans des tissus myélinisés, mais rarement dans les lésions actives (Prineas *et al.* 2001; Barnett *et al.* 2009a; van Noort *et al.* 2011), chez la plupart des patients (van Horssen *et al.* 2012). Certains nodules sont caractérisés par un dépôt de complément activé (fragment C3d) et entourent souvent des axones partiellement démyélinisés (Prineas *et al.* 2001; Barnett *et al.* 2009a). Dans les LDP, une forte densité en cellules microgliales IBA-1⁺ apparaît propice à la formation de nodules, contrairement à la SBAN et la SGAN où les nodules sont peu nombreux. L'absence de marqueur de prolifération, un effet seuil de la densité microgliale à partir de laquelle se forment des nodules et la présence d'un halo vide de cellules microgliales autour des nodules suggèrent que les nodules microgliaux se formeraient plutôt par attraction dans les LDP. De même, l'augmentation de la densité microgliale dans les LDP pourrait être due en partie à leur prolifération mais aussi à la migration des cellules microgliales des plaques démyélinisées, progressivement déplétées, vers les LDP.

On peut s'interroger sur la nature pathogénique, ou protectrice, des nodules microgliaux au sein des LDP. Dans la SEP, ces nodules sont souvent considérés comme des **lésions pré-actives** en raison de leur présence dans des zones relativement préservées, fréquemment autour de vaisseaux remplis de lymphocytes. Ils pourraient être à l'origine de nouvelles lésions (De Groot *et al.* 2001; van Noort *et al.* 2011; van Horssen *et al.* 2012). Dans l'hypothèse H_A, les LDP représentent un stade précoce de formation des lésions, compatible avec la notion de lésion pré-active. L'observation des nodules autour des plaques démyélinisées suggère qu'elles continueraient de s'étendre par les mêmes mécanismes qui lui ont donné naissance. Cependant, les auteurs, qui se sont attardés spécifiquement sur les nodules, ont l'intuition qu'il s'agit d'un stade réversible de l'initiation d'une lésion (van Noort *et al.* 2011; van Horssen *et al.* 2012). Des mécanismes protecteurs participeraient alors à la résorption des nodules. Cette équipe a montré qu'ils expriment à la fois des signaux pro- et anti-inflammatoires (IL-10 et TNF- α) (van Horssen *et al.* 2012), comme le suggère aussi notre analyse transcriptomique des LDP. Ensuite, une étude récente a observé des nodules microgliaux, dans les périplaques, préférentiellement autour des axones altérés

et rarement autour de vaisseaux (Singh *et al.* 2013). Cette étude propose que les nodules ne sont pas nécessairement voués à induire la démyélinisation complète mais qu'ils participent activement aux altérations tissulaires en général, venant s'ajouter aux mécanismes de dégénérescence secondaire. En effet, ces nodules expriment fortement des sous-unités de NOX2 impliquée dans le stress oxydatif. De plus, dans cette étude, l'absence de rupture de la BHE appuie la nature intrinsèque au SNC du *stimulus* induisant la formation des nodules microgliaux. Enfin, une autre équipe a suggéré que les nodules microgliaux, observés dans un modèle de la SLA, étaient formés de cellules microgliales en dégénérescence (Fendrick *et al.* 2007).

L'hypothèse H_C de formation des LDP pourrait réconcilier ces différentes visions des nodules microgliaux. **Au sein des LDP, les nodules reflèteraient une partie de la réponse microgliale aberrante que nous avons décrite au début de cette discussion. Une activation répétée et perpétuelle des cellules microgliales maintiendraient leur état « primé » et délétère à bas bruit, car résultant d'un équilibre entre des signaux pro- et anti-inflammatoires.** Il faudrait analyser de plus près la nature des nodules microgliaux des LDP pour comprendre les mécanismes mis en jeu.

Les altérations diffuses, la SBAD et les LDP, une même entité ?

Moins flagrantes que les nodules microgliaux sont les altérations cellulaires diffuses. Décrites en particulier au sein de la SBAN, notamment par notre équipe, elles sont caractérisées par une perte axonale diffuse (Losseff *et al.* 1996; Brück *et al.* 1997; Fu *et al.* 1998; Evangelou *et al.* 2000; Bjartmar *et al.* 2000; Pelletier *et al.* 2003; Kutzelnigg *et al.* 2005; Androdias *et al.* 2010), un stress oxydatif, des altérations gliales et une inflammation diffuse (Kutzelnigg *et al.* 2005; Zeis *et al.* 2008a). Les altérations observées dans les LDP pourraient correspondre à une forme plus marquée de l'atteinte diffuse, ce qui est compatible avec l'hypothèse H_B. Dans ce cas, elles précéderaient la formation des plaques de démyélinisation, introduisant une vision concentrique de la formation des plaques. Des altérations de plus en plus prononcées soutiendraient la formation des plaques en induisant l'activité phagocytaire de « nettoyage » des cellules microgliales.

Pour affiner cette hypothèse, il serait utile de savoir si les altérations décrites dans les LDP sont équivalentes à celles décrites dans la substance blanche d'apparence douteuse (SBAD) le plus souvent observées autour des lésions. En IRM, la SBAD est associée à un signal intermédiaire entre le signal produit par la SBAN et celui des lésions classiques (Bot *et al.* 2004; Moore *et al.* 2008; Seewann *et al.* 2009; Moll *et al.* 2011). Des corrélations ont été réalisées avec les données histologiques mais la nature de la SBAD reste débattue. La perte de myéline, la perte axonale,

l'activation microgliale modérée et la gliose chronique fibrillaire observées dans la SBAD en absence de pathologie aiguë de l'axone, en absence de remyélinisation et d'altération de la BHE (Seewann *et al.* 2009; Filippi & Rocca 2010), sont très proches des altérations décrites dans les LDP. De plus, la graduation des altérations, depuis la lésion vers la SBAN, décrites dans les LDP, a récemment été démontrée au sein de la SBAD (Zhang *et al.* 2013a). Certains auteurs proposent que les SBAD constituent des micro-lésions pré-actives ou un stade précoce de l'atteinte tissulaire (Ropele *et al.* 2000; Ge *et al.* 2003) comme cela pourrait être le cas pour l'hypothèse H_B de formation des LDP. Au contraire, d'autres études suggèrent que la SBAD constitue une entité pathologique à part entière mettant en jeu des mécanismes chroniques différents de ceux impliqués dans la plaque comme nous le proposons dans l'hypothèse H_C (Seewann *et al.* 2009; Vrenken *et al.* 2010). Enfin, des techniques de reconstitution des signaux IRM à partir de tissus *post-mortem* pourraient permettre de réellement comprendre à quoi correspondent les LDP en IRM et réciproquement de mieux analyser les données IRM.

L'atteinte primitive de la myéline

Un cas particulier de l'hypothèse H_B pourrait correspondre à une atteinte primitive cellulaire du SNC. Depuis la description de l'apoptose des oligodendrocytes par Barnett et Prineas au sein des lésions qu'ils qualifiaient de « pré-phagocytaires » (Barnett & Prineas 2004), des marqueurs d'une atteinte précoce de la myéline ont été recherchés. Suite à notre observation d'un gonflement apparent des gaines de myéline au sein des LDP par rapport aux gaines de myéline de la SBAN, l'hypothèse d'une atteinte primitive de la myéline était attirante. La perturbation de la compaction myélinique pourrait être due aux altérations gliales des LDP susceptibles de modifier la régulation en eau et l'homéostasie ionique. Néanmoins, il ne nous est pas possible de soutenir cette hypothèse tant que l'observation n'est pas confirmée par microscopie électronique. Il serait pertinent de s'attarder sur le statut des corps oligodendrocytaires dans les LDP. De façon très intéressante, une étude toute récente a montré que la myéline isolée à partir d'échantillons *post-mortem* de patients SEP étaient phagocytée plus efficacement que celle isolée à partir de donneurs sains par des macrophages ou cellules microgliales humaines en culture (Hendrickx *et al.* 2014). Ces données indiquent que des **changements précoces de la myéline** précéderaient l'activation des macrophages/cellules microgliales et la démyélinisation. Une étude similaire, comparant la myéline isolée des LDP à celle de la SBAN, sans compter les difficultés techniques qu'elle représente, offrirait l'opportunité d'identifier des changements myéliniques précoces. De même, l'hypothèse de pré-conditionnement tissulaire a longtemps contenté l'explication de l'alternance des lésions concentriques observées dans la sclérose de Baló et dans quelques cas de SEP (Stadelmann *et al.*

2005). Dans cette vision, l'expression des molécules de pré-conditionnement limiterait l'expansion de la démyélinisation.

3) Comment les lésions SEP s'étendent-elles ?

Les mécanismes classiques

L'avancée de la démyélinisation est, le plus souvent, attribuée à l'activité cytotoxique des cellules immunes, en particulier l'activité phagocytaire des macrophages et des cellules microgliales activées. Cette vision a d'ailleurs conduit à classifier l'activité des plaques en trois groupes peut être trop restrictifs : active, chronique active et chronique inactive. Au sein des LDP, l'activité de phagocytose que nous avons pu mettre en évidence, soit par le marquage ORO soit par des observations confocales, est relativement peu fréquente. Pourtant la démyélinisation semble se poursuivre. Elle pourrait donc être en partie due au potentiel cytotoxique des substances solubles relarguées par les macrophages/cellules microgliales. La faible occurrence des événements de phagocytose est le premier argument en faveur de mécanismes chroniques de l'inflammation au sein des LDP comme dans l'hypothèse H_C. Pour que la comparaison avec l'activité des plaques associées aux LDP soit plus riche, il aurait sans doute fallu introduire, dans notre étude comparative, des échantillons micro-disséqués des plaques de démyélinisation. Nous pensons que les plaques complètement démyélinisées seraient trop pauvres en informations, notamment concernant l'état de la myéline.

Le maintien de l'inflammation dans une plaque est en partie dû à l'entretien de la réponse auto-immune antigène-spécifique. Les macrophages/cellules microgliales ayant phagocyté la myéline pourraient se différencier en cellules dendritiques, sortir du SNC, rejoindre les ganglions lymphatiques cervicaux et participer à l'activation des lymphocytes en périphérie (Carson 2002). Nous avons exclu, peut-être un peu rapidement, l'analyse de la biologie des lymphocytes dans les LDP. En effet, l'étude précédente, menée au laboratoire, avait montré la forte dispersion des LT au sein des échantillons de moelle épinière de la même cohorte de patients (Androdias *et al.* 2010). Toutefois, ce n'est pas parce que les LT sont rares et disséminés, qu'ils ne peuvent pas avoir une action déterminante dans les mécanismes pathogéniques observés. Il pourrait être judicieux de regarder, de plus près, l'accumulation des LT dans les LDP, en particulier en fonction de l'activité des plaques associées. D'ailleurs, plusieurs gènes associés à l'inflammation, soulignés dans notre analyse transcriptomique, sont aussi impliqués dans la signalisation des LT. L'étude précédente avait mis en évidence la corrélation entre l'accumulation des LT dans les méninges de la moelle épinière à l'expression de CMH de classe II par les macrophages/cellules microgliales d'une part et

à la perte axonale d'autre part dans la SBAN (Androdias *et al.* 2010). On peut donc se demander si cette corrélation existe de la même façon dans les LDP, ce qui apporterait une information concernant les mécanismes de présentation antigénique.

Pourquoi certaines lésions SEP stoppent-elles leur progression ?

Le chercheur clinicien se demande comment limiter la progression des plaques de démyélinisation. Le biologiste fondamental se demande peut-être pourquoi les lésions cessent de se développer (Frohman *et al.* 2006). En effet, des mécanismes, différents de la réparation tissulaire, semblent limiter l'expansion des plaques de démyélinisation. Est-ce qu'il s'agit de la perte du signal initial à l'origine de la formation des plaques ? de l'épuisement des cellules microgliales ? Les LDP pourrait également être vue comme une zone tampon entre le tissu lésé et le tissu sain, limitant pendant un temps l'extension de la lésion puis conduisant à des événements délétères à bas bruit. En témoigne l'équilibre entre les signaux pro- et anti-inflammatoires. Le remodelage tissulaire créerait une barrière aux mécanismes de propagation des plaques. Toutefois, dans la moelle épinière, les plaques de démyélinisation et les LDP occupent la majeure partie de la surface. Ainsi, tout mécanisme pouvant limiter l'étendue des lésions semble inefficace à ce niveau.

Les LDP, une forme chronique d'extension des lésions ?

Malgré les arguments précédents, nos observations soutiennent majoritairement l'hypothèse H_C. Celle-ci introduit une notion de dissociation temporelle du développement de la plaque puis des altérations de la périplaque qui se propageraient de manière chronique. Nous avons défendu cette hypothèse dans l'article en cours de publication dans le journal *Glia*. Plusieurs arguments la soutiennent.

Tout d'abord, dans la moelle épinière des patients SEP de formes progressives, les LDP sont caractérisées par une perte lente et progressive de la myéline. En effet, la perte est similaire pour les différents marqueurs de myéline MBP, MOG et PLP et l'activité de phagocytose de myéline (ORO⁺) existe à bas bruit. La perte de myéline est plus importante que la perte axonale observée dans les LDP, suggérant que la perte de myéline, à bas bruit, se superpose aux mécanismes classiques de dégénérescence Wallerienne contribuant également à une perte myélinique secondaire.

De plus, les altérations cellulaires décrites, astrocytaires et macrophagiques/microgliales, suggèrent qu'un dialogue s'établit entre les cellules gliales, de manière spécifique au sein des LDP

(Fig. 4). Nous proposons qu'un processus chronique de remodelage tissulaire s'opère au sein des LDP, faisant de cette entité un compartiment à part entière. Le mécanisme de « priming » des cellules microgliales, atteignant, dans ce cas, un état d'activation particulier suite aux vagues successives de signaux pro- et anti-inflammatoires, en est un exemple. Une étude de modélisation de la formation des plaques a montré que le degré d'agressivité et la vitesse de déplacement des cellules microgliales étaient des paramètres déterminants dans le patron géométrique des plaques de démyélinisation (Khonsari & Calvez 2007). Une forte agressivité et une vitesse élevée suffirait à induire des motifs de démyélinisation concentriques comme ceux observés dans la sclérose de Baló. On peut alors penser qu'une agressivité très faible des cellules microgliales, particulière aux LDP, soit à l'origine d'une deuxième phase de progression du front de démyélinisation, plus lente que la première phase. Ainsi, le maintien de processus inflammatoires à bas bruit dans les LDP contribuerait, du moins en partie, à perpétuer voire étendre la démyélinisation progressive des périplaques et empêcher la remyélinisation. A ce sujet, aucun signe de remyélinisation n'est pu être observé dans notre étude, ce qui est cohérent étant donné le stade tardif des patients analysés. En effet, les processus de remyélinisation semblent s'atténuer avec les années (Kuhlmann *et al.* 2008a; Höftberger *et al.* 2010).

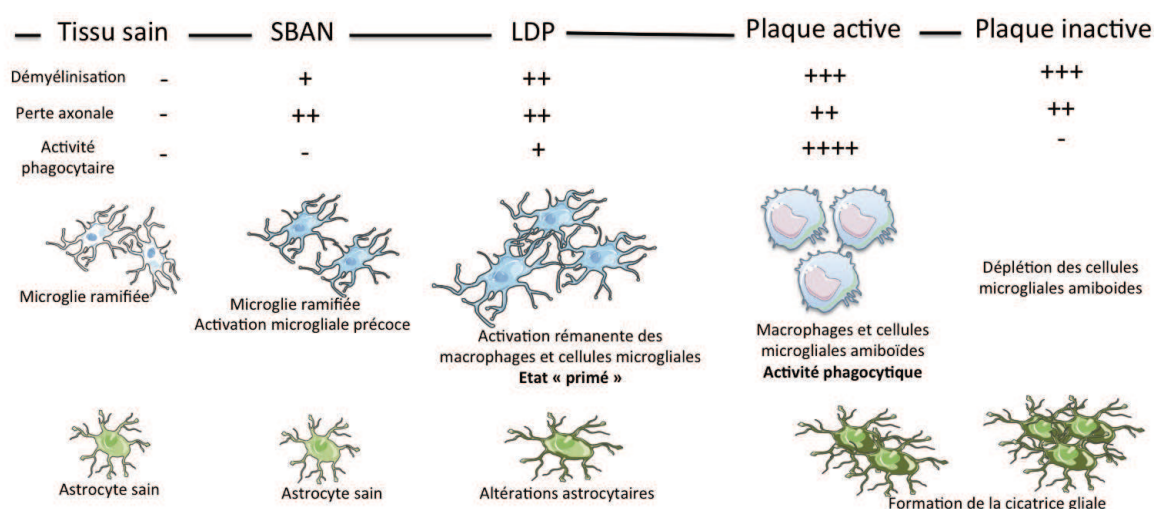


Figure 4 : Caractéristiques histologiques des LDP.

Néanmoins, n'oublions-pas que l'inconvénient de travailler avec des tissus *post-mortem* est l'absence de dimension temporelle. Il serait très intéressant de suivre en fonction du temps l'évolution des LDP, par exemple par IRM, d'où la nécessité de comprendre à quels signaux IRM correspondent les LDP.

L'atteinte astrocytaire trop longtemps oubliée

Une de nos observations majeures est la présence de fines altérations astrocytaires au sein des LDP. Des molécules spécifiquement astrocytaires, incluant AQP4, Cx43 et le transporteur de

glutamate EAAT1 sont exprimés plus fortement dans les LDP que dans la SBAN, au niveau transcriptomique et protéique. Les niveaux d'expression d'autres ARN, codant notamment pour les protéines astrocytaires CD44, TrkB, TrkC, EAAT2 et le système Xc, sont également augmentés. Nous en avons conclu qu'un processus chronique de remodelage tissulaire s'opérait au sein des LDP. Cette conclusion peut paraître hâtive mais elle s'inscrit dans une littérature qui laisse de plus en plus de place aux altérations astrocytaires dans la physiopathologie de la SEP.

Préalablement, des anomalies fonctionnelles des astrocytes ont été décrites au sein de certaines lésions SEP actives avant la démyélinisation complète (Sharma *et al.* 2010; Misu *et al.* 2013; Nijland *et al.* 2014). Dans le modèle de démyélinisation induite par le LPS, les altérations astrocytaires succèdent à l'activation microgliale mais précèdent la démyélinisation (Sharma *et al.* 2010). Les astrocytes altérés perdraient leurs fonctions protectrices intrinsèques envers les neurones mais aussi les oligodendrocytes. Notamment, les anomalies de l'expression des connexines décrites dans les LDP, c'est-à-dire, l'augmentation de la Cx43 astrocytaire et la diminution de la Cx47 oligodendrocytaire, ont également été décrites au sein des lésions chroniques et perturberaient la communication astrocyte-oligodendrocyte (Markoullis *et al.* 2012). Or, les astrocytes fournissent aux oligodendrocytes du lactate nécessaire au métabolisme axonal (Funfschilling *et al.* 2013). Ensuite, des anomalies de l'expression des transporteurs de glutamate EAAT1 et EAAT2 ont été décrites dans les lésions chroniques (Vallejo-Illarramendi *et al.* 2006; Newcombe *et al.* 2008), comme dans les LDP. Ces transporteurs assurent la recapture du glutamate au potentiel excitotoxique pour les neurones et les oligodendrocytes. L'augmentation de leur expression pourrait être le témoin d'une capture de glutamate anormale, à laquelle contribuerait l'augmentation de l'expression du système Xc de relargage du glutamate par les astrocytes. De même, des anomalies de l'expression d'AQP4 (Sinclair *et al.* 2007; Misu *et al.* 2007; Roemer *et al.* 2007) et de TrkB (Colombo *et al.* 2012) ont été décrites dans les tissus SEP. Enfin, les altérations astrocytaires contribueraient également à l'échec de la remyélinisation dans les LDP, soit en contribuant au profil délétère des cellules microgliales soit par des effets directs sur les oligodendrocytes et les OPC. En effet, les astrocytes non altérés favorisent le nettoyage des débris myéliniques par les cellules microgliales nécessaire à la remyélinisation (Skripuletz *et al.* 2013). Au contraire, les astrocytes altérés produiraient des facteurs pro-inflammatoires participant à l'activation des cellules microgliales cytotoxiques et favorisant l'apoptose des oligodendrocytes (Li *et al.* 2005). Il a aussi été montré que les astrocytes réactifs des lésions chroniques expriment fortement CD44, comme dans les LDP, et que la fixation de son ligand inhiberait la maturation des OPC (Back *et al.* 2005).

Ces changements moléculaires seraient donc suffisants pour altérer les fonctions essentielles des astrocytes, notamment le support trophique et fonctionnel indispensables aux axones et aux oligodendrocytes. Si nous ne prétendons pas que ces changements sont suffisants pour maintenir

l'inflammation à bas bruit des LDP, ils démontrent que des changements astrocytaires s'installent avant l'apparition d'une réelle cicatrice gliale. Ainsi, ils contribueraient à une démyélinisation lente et à l'absence de remyélinisation dans les LDP. Nous ne savons pas s'il est réellement approprié de qualifier ces astrocytes de « réactifs ». En effet, les astrocytes réactifs sont habituellement hypertrophiés. Dans les LDP, nous n'avons pas observé d'augmentation de l'expression de GFAP au niveau ARN. Le marquage GFAP a démontré une très faible hypertrophie cellulaire qui pourrait correspondre à l'initiation du réarrangement des filaments GFAP. Enfin, à l'instar des profils macrophagiques/microgliaux, une approche de microdissection virtuelle pour les astrocytes serait intéressante pour comparer les altérations astrocytaires d'une pathologie à l'autre.

4) Implications cliniques et directions futures des LDP

Les **thérapies anti-inflammatoires** ont prouvé leur efficacité sur les phases rémittentes de la SEP. Même si des stratégies complémentaires sont à envisager pendant les phases progressives, les traitements anti-inflammatoires pourraient limiter l'expansion chronique des LDP. En effet, ils continueraient d'inhiber les effets cytotoxiques des cellules microgliales, voire de favoriser un profil protecteur. Les mécanismes de **remodelage tissulaire** observés au sein des LDP pourraient fournir de nouvelles cibles thérapeutiques. Cette stratégie ne serait pas sans risque. En effet, le remodelage tissulaire, même s'il devient délétère à bas bruit, a sans doute une vocation initiale protectrice afin de limiter l'étendue des lésions aiguës. A ce sujet, il serait intéressant d'analyser les corrélations potentielles qui pourraient exister entre l'étendue des LDP et les données cliniques des patients. Pour cela, il faudrait avoir accès à la charge lésionnelle totale en plaque et LDP de la moelle épinière des patients, ce qui n'est pas réellement envisageable en *post-mortem*. Il faudra attendre qu'un signal IRM soit définitivement associé aux altérations de type LDP pour réaliser cette analyse.

On peut regretter alors les limitations descriptives de notre étude. La plupart de nos données sont effectivement des observations conduisant à des conclusions qui ne sont en réalité que des corrélations. Par exemple, nous avons montré que l'accumulation des macrophages/cellules microgliales est corrélée avec la perte de myéline et non avec la perte axonale au sein des LDP. En ce sens, nous avons observé des images de phagocytose de débris myéliniques, mais des études mécanistiques sont requises pour expliquer les mécanismes moléculaires mis en jeu. Pour cela, nous aurions souhaité reproduire *in vitro* le **milieu cytokinique observé dans les LDP** et comprendre son effet sur les fonctions et les phénotypes des cellules gliales, en particulier les cellules microgliales et les astrocytes. En effet, certaines cytokines, comme TGF- β , ont été souvent étudiées *in vitro* mais leurs actions peuvent être contradictoires lorsqu'elles sont au sein d'un cocktail

cytokinique particulier. De plus, des cytokines, comme IL-27 et APRIL, sont beaucoup moins connues au sein du SNC. IL-27, par exemple, aussi appelée IL-17D, est une cytokine aux propriétés pro- et anti-inflammatoires qui pourrait activer ou inhiber l'activité des macrophages (Baker *et al.* 2010; Guzzo *et al.* 2012; Hirase *et al.* 2013). Elle serait sécrétée par les monocytes, les macrophages et les cellules dendritiques mais aussi par les astrocytes (Pflanz *et al.* 2002; Yang *et al.* 2012a). Elle inhiberait la différenciation des LT en Th17 et réduirait la sévérité de l'EAE, probablement en favorisant la différenciation des LT régulateurs (Fitzgerald *et al.* 2007; Villarino *et al.* 2010; Yang *et al.* 2012a). Le niveau d'IL-27 étant réduit dans le sérum des patients SEP, son potentiel thérapeutique est à considérer sérieusement (Jankowski *et al.* 2010; Babaloo *et al.* 2013). Au contraire, APRIL, de nature pro-inflammatoire et plus connue pour ses effets sur la prolifération et la différenciation des lymphocytes B (Vincent *et al.* 2013), pourrait être sécrétée par les macrophages/cellules microgliales, notamment sous l'effet du TGF- β (Jang *et al.* 2011), et agir sur les autres cellules gliales dont les astrocytes. Le niveau d'expression d'APRIL serait plus élevé chez les patients SEP que chez les contrôles (Thangarajh *et al.* 2005). Il s'agirait d'une cible thérapeutique à envisager. Par conséquent, il serait intéressant de tester les effets conjoints de ces cytokines sur des modèles de culture microgliale, astrocytaire ou oligodendrocytaire pour comprendre le rôle immunitaire et sur le remaniement tissulaire : analyser leurs effets sur la prolifération et la différenciation des OPC, sur l'activité phagocytaire et cytotoxique des macrophages/cellules microgliales, sur l'expression de leurs marqueurs phénotypiques et sur l'expression des molécules astrocytaires perturbées dans les LDP. Cela nous permettrait de savoir si le milieu cytokinique mis en évidence est directement lié aux phénotypes des cellules gliales des LDP et de mieux comprendre les mécanismes sous-jacents à la formation des LDP.

5) Et si les lésions de la moelle épinière étaient différentes de celles du cerveau ?

Quel que soit le mécanisme de formation des LDP, elles ont potentiellement un fort impact sur le développement de l'atteinte neurologique des patients SEP. Leur fréquence et leur étendue dans les échantillons de moelle épinière que nous avons étudiés a ravivé l'importance de s'intéresser aux lésions de la moelle épinière chez les patients SEP. En introduction, nous avons déjà évoqué le fait que les études IRM sur la moelle épinière soient moins nombreuses que celles sur le cerveau pour des questions de limitations techniques. Les études neuropathologiques, également moins nombreuses, se multiplient (Nijeholt *et al.* 1998, 2001; DeLuca *et al.* 2006; Schirmer *et al.* 2009, 2011; Tallantyre *et al.* 2009, 2010). Le problème des études existantes est

qu'elles ont rarement été réalisées conjointement sur le cerveau des mêmes cas SEP. On ne peut donc pas conclure quant à la spécificité médullaire des observations, ce qui est également le cas pour notre étude. Néanmoins, lors de la sélection des échantillons au sein de la banque de tissus de Londres, nous avons pu observer, sur quelques échantillons *post-mortem* de cerveau, des lésions similaires aux LDP autour des plaques de démyélinisation. Beaucoup de photos de la littérature vont dans le même sens. Ces observations, basées uniquement sur une faible densité de marquage MOG ou LFB, suggèrent que les LDP ne seraient pas strictement spécifiques de la moelle épinière. Nous souhaiterions réaliser une étude longitudinale qui analyserait des échantillons de moelle épinière et de cerveau des mêmes patients afin d'apporter des éléments de réponse plus précis. Malheureusement, les échantillons de moelle épinière et de cerveau ont souvent été répartis séparément dans les laboratoires de recherche depuis les banques de tissus, rendant leur rapprochement difficile.

De façon plus générale, on peut se demander **s'il existe une spécificité des lésions de la moelle épinière** dans la SEP. S'il existe des mécanismes similaires d'expansion des plaques ou des LDP dans la moelle épinière et dans le cerveau, la spécificité de la moelle épinière pourrait résider dans le fait que les mécanismes qui limitent l'expansion des lésions ne sont pas suffisants pour éviter que l'ensemble de la surface d'une section de moelle épinière soit touchée. En effet, l'importance des tractus moteurs et sensitifs contenus dans la moelle épinière confère aux lésions médullaires un impact fonctionnel plus sévère. La charge lésionnelle médullaire serait donc plus étroitement corrélée au handicap que ne l'est la charge lésionnelle cérébrale (Stankiewicz *et al.* 2009). Il n'est donc pas étonnant que les lésions de la moelle soient impliquées dans les formes progressives de la maladie. Les patients stables présentent moins de lésions de la moelle (Filippi *et al.* 2006) et le ratio lésionnel moelle/cerveau est plus élevé dans les formes progressives de la SEP (Bramow *et al.* 2010). Dans ces formes progressives, le handicap des patients serait corrélé à l'étendue de la démyélinisation dans la moelle épinière mais ne le serait pas dans le cerveau (Bramow *et al.* 2010). La démyélinisation serait même plus importante dans la moelle épinière des formes secondairement progressives plutôt que dans les formes primitivement progressives (Tallantyre *et al.* 2009). Dans nos échantillons, il ne semble pas y avoir de différence entre l'étendue des LDP chez les patients atteints de formes premièrement ou secondairement progressives.

Les progrès de techniques IRM permettent maintenant de mieux comprendre les substrats pathologiques des lésions IRM médullaires (Agosta *et al.* 2007a; Bosma & Stroman 2012; Oh *et al.* 2013; Naismith *et al.* 2013; Poretti & Huisman 2013). Elles ont réussi à montrer des aberrations structurelles, fonctionnelles et métaboliques dans la moelle épinière de patients SEP, corrélées au handicap des patients (Ciccarelli *et al.* 2007; Freund *et al.* 2010). Par exemple, les techniques

d'imagerie de diffusion (DTI : Diffusion tensor images) permettent d'identifier les tractus touchés de la moelle épinière et de mieux comprendre leur impact clinique (Naismith *et al.* 2013). Les IRM fonctionnelles ont montré une hyper-activité au sein de la moelle épinière des patients (Agosta *et al.* 2008). Les techniques de spectroscopie permettent de quantifier des altérations cellulaires dans la SB et la SG de la moelle épinière (Solanky *et al.* 2013). Entre autres, la réduction ou l'augmentation de NAA dans la moelle épinière, reflétant la perte neuronale, sont respectivement corrélés au déficit moteur ou à la récupération chez des patients atteints de formes rémittentes (Ciccarelli *et al.* 2010a; b). Par rapport au cerveau, une étude histologique et électrophysiologique a montré que la perte des motoneurons inférieurs de la moelle épinière serait plus importante que celle des motoneurons supérieurs (Vogt *et al.* 2009). En ce sens, l'atrophie de la moelle épinière pourrait évoluer indépendamment de celle du cerveau (Cohen *et al.* 2012).

Plusieurs éléments suggèrent que les mécanismes cellulaires mis en jeu dans la moelle épinière pourraient être subtilement différents de ceux engagés dans le cerveau. Tout d'abord, la nature de l'activation microgliale pourrait être différente dans la moelle par rapport au cerveau (Schnell *et al.* 1999; Stoll *et al.* 2006), ce qui contribuerait à la divergence entre les programmes d'activation microgliale mis en évidence dans les LDP de la moelle épinière et ceux des lésions corticales. La séquence d'activation pourrait aussi être différente notamment à cause des possibles variations de susceptibilité de la BHE du cerveau et de la moelle épinière (Juhler *et al.* 1984; Silwedel & Förster 2006). La densité microgliale serait aussi plus importante dans la moelle épinière que dans le cerveau et la répartition des cellules microgliales serait plus homogène dans la moelle épinière, suggérant une propagation plus facile des mécanismes lésionnels (Stoll *et al.* 2006). En conditions physiologiques, elles exprimeraient des niveaux similaires de CMH de classe II et de CD68 le long de la moelle épinière, contrairement au cerveau où une répartition hétérogène impliquerait des niveaux de réponse microgliale différents. Au niveau de l'inflammation également, les follicules B des méninges seraient moins nombreux dans la moelle épinière (Howell *et al.* 2011). Enfin, des arguments suggèrent une remyélinisation moins efficace dans la moelle épinière comparée au cerveau. Dans nos échantillons, nous n'avons pas identifié de zones de remyélinisation, ce qui suggère soit que cet événement est rare dans la moelle épinière des patients atteints de formes progressives soit qu'il s'agit d'un biais de nos échantillons qui ont été sélectionnés notamment pour la présence de larges lésions de démyélinisation. D'autre part, l'origine différente des oligodendrocytes pendant le développement de la moelle épinière et du cerveau pourrait expliquer des mécanismes de remyélinisation différents (Wolswijk 2002; Le Bras *et al.* 2005; Vallstedt *et al.* 2005; Chandran *et al.* 2008).

C. Neuro-inflammation vs. neuro-dégénérescence dans la SEP

1) Une balance omniprésente

La notion de **neuro-inflammation** est relativement récente. D'après une recherche sur *PubMed*, le terme n'apparaît pas avant 1995. Auparavant, on parlait de gliose réactionnelle désignant une réponse passive à l'atteinte du SNC, encore considéré comme « immuno-privilegié » (Streit *et al.* 2004). Le terme de neuro-inflammation a introduit une **vision active, voire pathogénique, de la réaction inflammatoire mise en place au sein du SNC**. Par analogie avec la réponse inflammatoire périphérique, la neuro-inflammation aiguë est distinguée de la neuro-inflammation chronique. La première consisterait en une activation gliale, sans altération de la BHE, conduisant à la réparation tissulaire. La seconde interviendrait dans les pathologies chroniques du SNC et résulterait d'une action conjointe des cellules immunes et du SNC.

Dans notre seconde étude, la **SEP** a été prise comme **la maladie neuro-inflammatoire de référence**. En effet, l'implication des cellules microgliales dans la phagocytose de la myéline et celle des lymphocytes dans les mécanismes auto-immuns ont une vieille histoire dans la physiopathologie de la SEP (Goldmann & Prinz 2013). Mais, la neuro-inflammation se voit aussi déterminante dans des pathologies non-inflammatoires à première vue (Cappellano *et al.* 2013). Dans les autres pathologies que nous avons étudiées, c'est-à-dire **la maladie d'Alzheimer, la SLA, la maladie de Huntington, la maladie de Parkinson et la schizophrénie**, l'atteinte primitive n'est *a priori* pas inflammatoire mais dégénérative, métabolique ou ischémique. La réponse gliale et inflammatoire, qui était associée à ces pathologies, était donc vue comme une simple gliose réactionnelle aspécifique sans grand intérêt (Zipp & Aktas 2006). La littérature grandissante à ce sujet a certes montré **des mécanismes immuns communs à l'ensemble de ces pathologies**, mais mettant en jeu des interactions complexes entre le SI et le SNC. Parmi elle, la première analyse du jeu de données que nous avons utilisé, réalisée par le réseau BrainNet Europe lui-même et qui n'a pas encore été publiée, a mis en évidence des voies immunitaires de signalisation moléculaire partagées par les six maladies. Elle soutient un rôle général de la neuro-inflammation dans la physiopathologie de ces maladies, en réponse à, et participant à la neuro-dégénérescence. Néanmoins, elle n'a pas identifié de signature cellulaire-spécifique de cette réponse. C'est pourquoi, nous avons de nouveau analysé ces données dans l'optique d'identifier des programmes d'activation macrophagique/microgliale et de compléter la première analyse.

Avant tout, nos observations confirment l'implication de l'activation macrophagique/microgliale au cours d'une atteinte neuronale et/ou neuro-dégénérative (Zipp & Aktas 2006; Stoll *et al.* 2006; Lucin & Wyss-Coray 2009). La littérature décrivant cette implication a été succinctement évoqué dans la partie bibliographique. Nos résultats démontrent qu'une **base commune à cette activation est partagée par la SEP et les autres pathologies étudiées**. Le profil macrophagique/microglial identifié dans la maladie de Huntington présente une faible spécificité. Il serait donc plus proche du profil d'activation basale commun aux différentes maladies. D'autre part, nous avons pu identifier **une signature particulière des activités macrophagiques/microgliales en fonction de leur microenvironnement et spécifique de chaque pathologie du SNC** (Fig. 5). Enfin, nos résultats soulignent la persistance de cette activation lors d'une inflammation chronique. Le microenvironnement des macrophages/cellules microgliales module vraisemblablement leurs propriétés jusqu'à ce qu'elles atteignent un état « primé », notion que nous avons déjà détaillée dans le contexte de la SEP. En retour, elles seraient impliquées dans la mise en place d'un remodelage tissulaire du SNC qui semble incapable de rétablir les conditions physiologiques initiales. Ainsi, les macrophages/cellules microgliales, continuellement activés par une atteinte neuronale spécifique, contribueraient aussi au maintien de la neuro-dégénérescence.

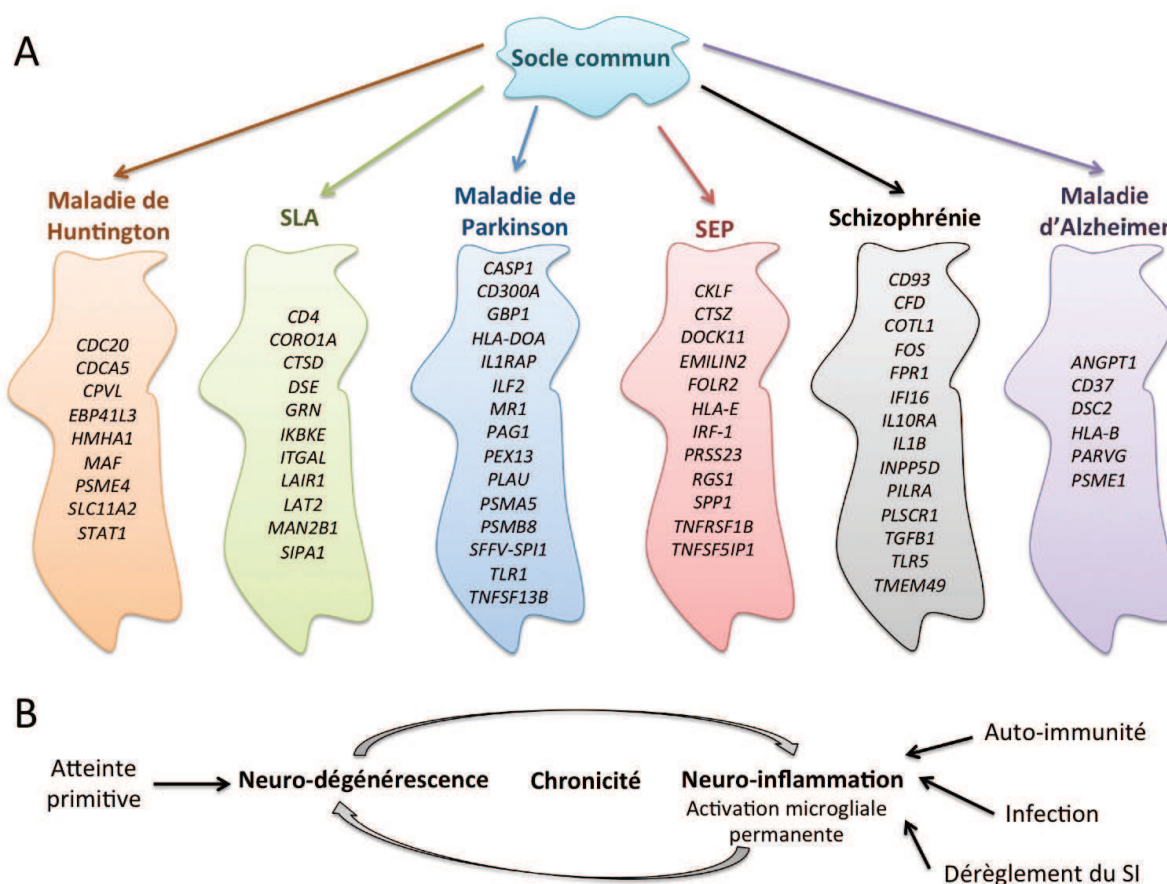


Figure 5 : Neuro-inflammation et Neuro-dégénérescence. A. Signature spécifique des programmes d'activation macrophagique/microgliale de chaque pathologie neuro-inflammatoire et neuro-dégénérative étudiée. B. Mise en place du cercle vicieux de la neuro-inflammation et de la neuro-dégénérescence au cours des pathologies chroniques.

Plus particulièrement dans la SEP, la neuro-inflammation et la neuro-dégénérescence semblent de moins en moins dissociables (Lassmann 2007; Stadelmann *et al.* 2011; Cappellano *et al.* 2013). Nous avons longuement décrit les processus neuro-inflammatoires. La neuro-dégénérescence se traduit par la perte axonale (Trapp *et al.* 1998; Lovas *et al.* 2000; Tallantyre *et al.* 2009), la perte neuronale (Peterson *et al.* 2001) et la perte synaptique (Wegner *et al.* 2006) mais aussi la perte des oligodendrocytes (Kuhlmann *et al.* 2008b). Quelques arguments suggèrent bien l'indépendance de la neuro-inflammation et de la neuro-dégénérescence, au moins en fonction du temps : l'atteinte oligodendrocytaire précédant l'inflammation (Barnett & Prineas 2004), la perte axonale des lésions inactives (Kornek *et al.* 2000), le faible degré d'inflammation des lésions corticales (Bø *et al.* 2003b), la progression de l'atrophie cérébrale en l'absence de nouvelles lésions rehaussées au Gadolinium et l'inefficacité dans le temps des thérapies immuno-modulatrices. Pourtant, des arguments encore plus nombreux semblent soutenir le lien inséparable entre les deux. Tout d'abord, les compartiments affectés sont les mêmes : les lésions focales de la SB, les lésions corticales et les méninges à proximité, l'atteinte diffuse de la SBAN. Plusieurs corrélations histologiques vont dans ce sens : la corrélation entre la perte axonale, l'inflammation et la durée de la maladie dans les stades précoces (Kuhlmann *et al.* 2002) et dans les formes progressives de la SEP (Frischer *et al.* 2009), la corrélation entre la perte axonale de la SBAN et l'inflammation des méninges au sein de la moelle épinière (Androdias *et al.* 2010) et enfin, la corrélation entre la pathologie corticale et l'inflammation des méninges (Howell *et al.* 2011).

2) La spécificité des formes progressives

Formes progressives vs. formes rémittentes

La différence de manifestation clinique qu'il existe entre les formes rémittentes et les formes progressives de la SEP continue de nous interroger sur la différence physiopathologique qui pourrait les distinguer. Il pourrait justement s'agir de la variation du degré d'indépendance liant les mécanismes neuro-inflammatoires et neuro-dégénératifs (Lassmann 2007; Lassmann *et al.* 2012). Du côté des formes rémittentes, les plaques focalisées sont formées par des vagues inflammatoires successives, en présence d'altérations de la BHE. L'établissement de la pathologie chronique renferme la réponse inflammatoire derrière une BHE préservée (Bradl & Lassmann 2009). Sa propagation conduit à une atteinte inflammatoire, lente et progressive, du tissu dans sa globalité, principalement représentée par la perte myélinique corticale extensive et la perte axonale diffuse de la SBAN, mais aussi les altérations diffuses des LDP de la moelle épinière. En effet, très peu de nouvelles lésions rehaussées au Gadolinium apparaissent en IRM dans les formes progressives.

L'inflammation évoluerait alors en partie indépendamment de la périphérie. En ce sens, davantage de lésions focalisées, en particulier les lésions actives classiques, seraient observées pendant les phases rémittentes (Kutzelnigg *et al.* 2005). Les lésions focalisées seraient plus confluentes et inactives pendant les phases progressives et des lésions diffuses de type LDP apparaîtraient au bord de ces lésions (Nijeholt *et al.* 2001; Ingle *et al.* 2003; Kutzelnigg *et al.* 2005; Bot & Barkhof 2009). Au contraire, la démyélinisation corticale et l'atteinte diffuse sont plus marquées dans les formes progressives et plus rares dans les formes rémittentes (Kutzelnigg *et al.* 2005). De même, l'atrophie de la moelle épinière, probablement due à la somme des lésions focales bordées des LDP, de la perte axonale diffuse et de la dégénérescence Wallérienne, serait plus importante dans les formes progressives que dans les formes rémittentes (Stevenson *et al.* 1998; Horsfield *et al.* 2010; Klein *et al.* 2011). Plusieurs études soutiennent que la perte axonale est le substrat pathologique des formes progressives (Tallantyre *et al.* 2009). Une telle dissociation des deux phases de la SEP pourrait expliquer pourquoi le nombre de poussées déclarées pendant la phase rémittente ne semble pas avoir d'incidence sur l'accumulation du handicap à long terme (Vukusic & Confavreux 2007; Scalfari *et al.* 2010; Bennetto *et al.* 2011).

Formes secondairement progressives vs. progressives d'emblée

Au sein de la moelle épinière, la perte axonale serait plus importante dans les formes progressives d'emblée que dans les formes secondairement progressives, ce qui est corrélé au handicap des patients (Tallantyre *et al.* 2009). Dans notre étude des LDP de la moelle épinière, les effectifs des patients étaient trop faibles pour pouvoir séparer les deux groupes. Il est intéressant de noter qu'une étude réalisée également sur des échantillons de moelle épinière avait remarqué la présence de lésions intermédiaires entre les lésions focalisées et la SBAN, similaires au LDP (Nijeholt *et al.* 2001). Dans cette étude, l'étendue de ce type lésionnel était plus grande chez les patients atteints de formes progressives d'emblée. Cette même équipe l'avait déjà suggéré dans ses études IRM (Lycklama *et al.* 1997; Nijeholt *et al.* 1998). Elle attribua donc ce type lésionnel aux formes progressives d'emblée, ce qui était cohérent avec leur fréquence moins élevée en infiltrats péri-vasculaires (Revesz *et al.* 1994; Kutzelnigg *et al.* 2005). Nos données ne permettent pas de confirmer cette spécificité. Au contraire, il ne faut pas oublier que notre étude transcriptomique n'a été réalisée que sur des échantillons de formes secondairement progressives. Nous ne pouvons donc pas généraliser nos conclusions aux formes progressives en général. Toutefois, la différence entre les formes progressives d'emblée et les formes secondairement progressives n'est pas systématique. Notamment, il n'y aurait pas de différence significative pour l'atteinte diffuse de la SB, l'activation microgliale diffuse et l'atteinte corticale (Rovaris *et al.* 2001a; Kutzelnigg *et al.* 2005).

CONCLUSION

Ce travail de thèse a permis de caractériser les programmes d'activation macrophagique et microgliale au sein de deux types lésionnels : 1) les zones partiellement démyélinisées bordant les lésions de la moelle épinière et 2) les lésions corticales, toutes deux étroitement liées aux formes progressives de la SEP et impliquées dans des atteintes neurologiques chroniques irréversibles. Etant donné l'absence de traitement réduisant de façon satisfaisante l'aggravation progressive des symptômes des patients, de nouvelles stratégies thérapeutiques sont à considérer sérieusement afin de cibler l'activation chronique des macrophages et des cellules microgliales qui contribuent grandement à la propagation des mécanismes lésionnels pendant la phase progressive de la SEP.

Au terme de ce travail, qui démontre encore une fois l'importance de travailler sur des tissus autopsiés pour déceler des mécanismes physiopathologiques et mieux comprendre l'avancée d'une maladie, nous avons acquis de nouvelles pistes qui devraient enrichir notre modèle conceptuel des formes progressives de la SEP. La plupart des questions soulevées par la présente étude devrait trouver des éléments de réponse dans des études futures, en particulier le suivi en temps réel, *in vivo*, de l'activation macrophagique/microgliale dans les modèles animaux et chez les patients, qui apporteront la composante temporelle à nos études. Aussi, de nombreuses hypothèses pourront être testées sur des modèles *in vitro* de lésions pré-actives afin de mieux comprendre la genèse des lésions et leur propagation.

De façon plus générale, ce type d'études nous fait prendre conscience de la complexité du SI. Jeu du hasard et de la spécificité, fait de compromis et d'ajustements, ce système est sensible au moindre dérèglement dont nous sommes loin de connaître la cause dans la SEP. Face à l'acquisition massive de données, comme les données transcriptomiques, la recherche sur le SI nécessite une mise en commun des données afin de les intégrer dans des modèles plus complexes et de comprendre, un jour, le fonctionnement conjoint, non dissociable, du SI et du SNC.

REFERENCES

- Abbas AK, Lichtman A, Pillai S (2012) Immunologic tolerance and autoimmunity. In: *Cellular and molecular immunology* (eds Abbas AK, Lichtman A, Pillai S), p. 319. Elsevier Saunders, Philadelphia.
- Abbas AR, Wolslegel K, Seshasayee D, Modrusan Z, Clark HF (2009) Deconvolution of blood microarray data identifies cellular activation patterns in systemic lupus erythematosus. *PLoS one*, **4**, e6098.
- Abbott NJ, Rönnbäck L, Hansson E (2006) Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier. *Nature reviews. Neuroscience*, **7**, 41–53.
- Aboul-Enein F, Lassmann H (2005) Mitochondrial damage and histotoxic hypoxia: a pathway of tissue injury in inflammatory brain disease? *Acta neuropathologica*, **109**, 49–55.
- Ben Achour S, Pascual O (2012) Astrocyte-neuron communication: functional consequences. *Neurochemical research*, **37**, 2464–73.
- Agosta F, Absinta M, Sormani MP *et al.* (2007a) In vivo assessment of cervical cord damage in MS patients: a longitudinal diffusion tensor MRI study. *Brain : a journal of neurology*, **130**, 2211–9.
- Agosta F, Pagani E, Caputo D, Filippi M (2007b) Associations between cervical cord gray matter damage and disability in patients with multiple sclerosis. *Archives of neurology*, **64**, 1302–5.
- Agosta F, Valsasina P, Rocca MA *et al.* (2008) Evidence for enhanced functional activity of cervical cord in relapsing multiple sclerosis. *Magnetic resonance in medicine : official journal of the Society of Magnetic Resonance in Medicine / Society of Magnetic Resonance in Medicine*, **59**, 1035–42.
- Ajami B, Bennett JL, Krieger C, McNagny KM, Rossi FM V (2011) Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool. *Nature neuroscience*, **14**, 1142–9.
- Ajmone-Cat AM, Mancini M, De Simone R, Cilli P, Minghetti L (2013) Microglial polarization and plasticity: Evidence from organotypic hippocampal slice cultures. *Glia*, **61**, 1698–1711.
- Akassoglou K, Bauer J, Kassiotis G *et al.* (1998) Oligodendrocyte apoptosis and primary demyelination induced by local TNF/p55TNF receptor signaling in the central nervous system of transgenic mice: models for multiple sclerosis with primary oligodendroglialopathy. *The American journal of pathology*, **153**, 801–13.
- Akiyama H, Barger S, Barnum S *et al.* (2000) Inflammation and Alzheimer's disease. *Neurobiology of aging*, **21**, 383–421.
- Alizadeh AA, Eisen MB, Davis RE *et al.* (2000) Distinct types of diffuse large B-cell lymphoma identified by gene expression profiling. *Nature*, **403**, 503–511.
- Allavena P, Mantovani A (2012) Immunology in the clinic review series; focus on cancer: tumour-associated macrophages: undisputed stars of the inflammatory tumour microenvironment. *Clinical and experimental immunology*, **167**, 195–205.
- Almstrup K, Nielsen JE, Hansen MA *et al.* (2004) Analysis of cell-type-specific gene expression during mouse spermatogenesis. *Biology of reproduction*, **70**, 1751–61.
- Altevogt BM, Paul DL (2004) Four classes of intercellular channels between glial cells in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 4313–23.
- Alvarez JI, Katayama T, Prat A (2013) Glial influence on the blood brain barrier. *Glia*, **61**, 1939–58.
- Ambrosini E, Aloisi F (2004) Chemokines and glial cells: a complex network in the central nervous system. *Neurochemical research*, **29**, 1017–1038.
- Ambrosini E, Remoli ME, Giacomini E *et al.* (2005) Astrocytes produce dendritic cell-attracting chemokines in vitro and in multiple sclerosis lesions. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **64**, 706–15.
- Amor S, Peferoen LAN, Vogel DYS *et al.* (2013) Inflammation in neurodegenerative diseases - an update. *Immunology*, **31**.
- Androdias G, Reynolds R, Chanal M *et al.* (2010) Meningeal T cells associate with diffuse axonal loss in multiple sclerosis spinal cords. *Annals of neurology*, **68**, 465–76.
- Annunziata P, Giorgio A, De Santi L *et al.* (2006) Absence of cerebrospinal fluid oligoclonal bands is associated with delayed disability progression in relapsing-remitting MS patients treated with interferon-beta. *Journal of the neurological sciences*, **244**, 97–102.
- Arnett H a, Mason J, Marino M *et al.* (2001) TNF alpha promotes proliferation of oligodendrocyte progenitors and remyelination. *Nature neuroscience*, **4**, 1116–22.
- Arnoux I, Hoshiko M, Mandavy L *et al.* (2013) Adaptive phenotype of microglial cells during the normal postnatal development of the somatosensory “Barrel” cortex. *Glia*, **61**, 1582–94.
- Arrang J-M (2007) Histamine and schizophrenia. *International review of neurobiology*, **78**, 247–87.
- Asai H, Kakita H, Aoyama M *et al.* (2013) Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced aquaporin-4 expression in cultured astrocyte. *Cellular and molecular neurobiology*, **33**, 393–400.
- Babaloo Z, Yeganeh RK, Farhoodi M *et al.* (2013) Increased IL-17A but decreased IL-27 serum levels in patients with multiple sclerosis. *Iranian journal of immunology : IJI*, **10**, 47–54.
- Babbe H, Roers A, Waisman A *et al.* (2000) Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *The Journal of experimental medicine*, **192**, 393–404.
- Back SA, Tuohy TMF, Chen H *et al.* (2005) Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nature medicine*, **11**, 966–72.

- Baker BJ, Park KW, Qin H, Ma X, Benveniste EN (2010) IL-27 inhibits OSM-mediated TNF- α and iNOS gene expression in microglia. *Glia*, **58**, 1082–93.
- Bakshi R, Kinkel P, Mechtler L *et al.* (1998) Magnetic resonance imaging findings in 22 cases of myelitis: comparison between patients with and without multiple sclerosis. *European journal of neurology : the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, **5**, 35–48.
- Bandtlow C, Zachleder T, Schwab ME (1990) Oligodendrocytes arrest neurite growth by contact inhibition. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **10**, 3837–48.
- Bannerman PG, Hahn A, Ramirez S *et al.* (2005) Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice. *Brain : a journal of neurology*, **128**, 1877–86.
- Bar-Or A, Calabresi PAJ, Arnold D *et al.* (2008) Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. *Annals of neurology*, **63**, 395–400.
- Barbeito A, Mesci P, Boillée S (2010) Motor neuron-immune interactions: the vicious circle of ALS. *J Neural Transm*, **117**, 981–1000.
- Barcia C, Ros CM, Annese V *et al.* (2011) IFN- γ signaling, with the synergistic contribution of TNF- α , mediates cell specific microglial and astroglial activation in experimental models of Parkinson's disease. *Cell death & disease*, **2**, e142.
- Barkhof F (2002) The clinico-radiological paradox in multiple sclerosis revisited. *Current opinion in neurology*, **15**, 239–45.
- Barnett MH, Henderson APD, Prineas JW (2006) The macrophage in MS: just a scavenger after all? Pathology and pathogenesis of the acute MS lesion. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, **12**, 121–32.
- Barnett SC, Linington C (2012) Myelination: Do Astrocytes Play a Role? . *The Neuroscientist* .
- Barnett MH, Parratt JDE, Cho E-S, Prineas JW (2009a) Immunoglobulins and complement in postmortem multiple sclerosis tissue. *Annals of neurology*, **65**, 32–46.
- Barnett MH, Parratt JDE, Pollard J, Prineas JW (2009b) MS : Is it One Disease ? *The international MS Journal*, **16**, 57–65.
- Barnett MH, Prineas JW (2004) Relapsing and remitting multiple sclerosis: pathology of the newly forming lesion. *Annals of neurology*, **55**, 458–68.
- Barnett MH, Sutton I (2006) The pathology of multiple sclerosis: a paradigm shift. *Current opinion in neurology*, **19**, 242–7.
- Barres BA, Raff MC (1993) Proliferation of oligodendrocyte precursor cells depends on electrical activity in axons. *Nature*, **361**, 258–260.
- Baumann N, Pham-Dinh D (2001) Biology of oligodendrocyte and myelin in the mammalian central nervous system. *Physiological reviews*, **81**, 871–927.
- Baxter AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nature reviews. Immunology*, **7**, 904–12.
- Bazakos C, Manioudaki ME, Therios I *et al.* (2012) Comparative transcriptome analysis of two olive cultivars in response to NaCl-stress. *PloS one*, **7**, e42931.
- Beers DR, Henkel JS, Xiao Q *et al.* (2006) Wild-type microglia extend survival in PU.1 knockout mice with familial amyotrophic lateral sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 16021–6.
- Beers DR, Zhao W, Liao B *et al.* (2012) Neuroinflammation modulates distinct regional and temporal clinical responses in ALS mice. *Brain Behav Immun.*, **25**, 1025–1035.
- Bélanger M, Magistretti PJ (2009) The role of astroglia in neuroprotection. *Dialogues Clin Neurosci*, **11**, 281–295.
- Belmadani A, Tran P, Ren D, Miller R (2009) Chemokines regulate the migration of neural progenitors to sites of neuroinflammation. *Journal of neuroscience*, **26**, 3182–3191.
- Bennett MVL, Garré JM, Orellana JA *et al.* (2012) Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain research*, **1487**, 3–15.
- Bennetto L, Burrow J, Sakai H *et al.* (2011) The relationship between relapse, impairment and disability in multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, **17**, 1218–24.
- Benveniste EN, Nguyen VT, O'Keefe GM (2001) Immunological aspects of microglia: relevance to Alzheimer's disease. *Neurochemistry International*, **39**, 381–391.
- Berer K, Mues M, Koutrolos M *et al.* (2011) Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*, **479**, 538–41.
- Bergers E, Bot JCJ, De Groot CJA *et al.* (2002) Axonal damage in the spinal cord of MS patients occurs largely independent of T2 MRI lesions. *Neurology*, **59**, 1766–71.
- Berman NE, Sheffield LG, Purcell J *et al.* (1998) Gradient of microglial activation in the brain of SIV infected macaques. *Journal of neuro-AIDS*, **2**, 43–54.
- Bessis A, Béchade C, Bernard D, Roumier A (2007) Microglial control of neuronal death and synaptic properties. *Glia*, **55**, 233–8.
- Biron KE, Dickstein DL, Gopaul R, Jefferies WA (2011) Amyloid triggers extensive cerebral angiogenesis causing blood brain barrier permeability and hypervascularity in Alzheimer's disease. *PloS one*, **6**, e23789.
- Bitsch a, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Brück W (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain : a journal of neurology*, **123** (Pt 6), 1174–83.

- Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD (2000) Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Annals of neurology*, **48**, 893–901.
- Bjartmar C, Kinkel RP, Kidd G, Rudick RA, Trapp BD (2001) Axonal loss in normal-appearing white matter in a patient with acute MS. *Neurology*, **57**, 1248–52.
- Björkqvist M, Wild EJ, Thiele J *et al.* (2008) A novel pathogenic pathway of immune activation detectable before clinical onset in Huntington’s disease. *The Journal of experimental medicine*, **205**, 1869–77.
- Black JA, Waxman SG, Smith KJ (2006) Remyelination of dorsal column axons by endogenous Schwann cells restores the normal pattern of Nav1.6 and Kv1.2 at nodes of Ranvier. *Brain : a journal of neurology*, **129**, 1319–29.
- Blalock JE (2005) The immune system as the sixth sense. *Journal of internal medicine*, **257**, 126–38.
- Bø L, Vedeler CA, Nyland HI, Trapp BD, Mørk SJ (2003a) Subpial demyelination in the cerebral cortex of multiple sclerosis patients. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **62**, 723–32.
- Bø L, Vedeler CA, Nyland H, Trapp BD, Mørk SJ (2003b) Intracortical multiple sclerosis lesions are not associated with increased lymphocyte infiltration. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, **9**, 323–31.
- Boche D, Perry VH, Nicoll JAR (2013) Review: activation patterns of microglia and their identification in the human brain. *Neuropathology and applied neurobiology*, **39**, 3–18.
- Bohatschek M, Kloss CUA, Pfeffer K, Bluethmann H, Raivich G (2004) B7.2 on activated and phagocytic microglia in the facial axotomy model: regulation by interleukin-1 receptor type 1, tumor necrosis factor receptors 1 and 2 and endotoxin. *Journal of neuroimmunology*, **156**, 132–45.
- Boillée S, Cleveland DW (2008) Revisiting oxidative damage in ALS: microglia, Nox, and mutant SOD1. *The Journal of Clinical Investigation*, **118**, 474–478.
- Boillée S, Yamanaka K, Lobsiger CS *et al.* (2006) Onset and progression in inherited ALS determined by motor neurons and microglia. *Science (New York, N.Y.)*, **312**, 1389–92.
- Boison D, Stoffel W (1994) Disruption of the compacted myelin sheath of axons of the central nervous system in proteolipid protein-deficient mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **91**, 11709–11713.
- Bonnet MC, Allard M, Dilharreguy B *et al.* (2010) Cognitive compensation failure in multiple sclerosis. *Neurology*, **75**, 1241–8.
- Börnsen L, Khademi M, Olsson T, Sørensen PS, Sellebjerg F (2011) Osteopontin concentrations are increased in cerebrospinal fluid during attacks of multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal*, **17**, 32–42.
- Bosanko C, Gilroy J, Wang A *et al.* (2003) West Nile Virus Encephalitis Involving the Substantia Nigra. *Archives of neurology*, **60**, 1148–1452.
- Bosma RL, Stroman PW (2012) Characterization of DTI Indices in the Cervical, Thoracic, and Lumbar Spinal Cord in Healthy Humans. *Radiology research and practice*, **2012**, 143705.
- Bot JCJ, Barkhof F (2009) Spinal-cord MRI in multiple sclerosis: conventional and nonconventional MR techniques. *Neuroimaging clinics of North America*, **19**, 81–99.
- Bot JCJ, Blezer ELA, Kamphorst W *et al.* (2004) The spinal cord in multiple sclerosis: relationship of high-spatial-resolution quantitative MR imaging findings to histopathologic results. *Radiology*, **233**, 531–40.
- Bouafia A, Golmard J-L, Thuries V *et al.* (2013) Axonal expression of sodium channels and neuropathology of the plaques in multiple sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology*.
- Boven LA, Van Meurs M, Van Zwam M *et al.* (2006) Myelin-laden macrophages are anti-inflammatory, consistent with foam cells in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **129**, 517–26.
- Bradl M, Lassmann H (2009) Progressive multiple sclerosis. *Seminars in immunopathology*, **31**, 455–65.
- Bramow S, Frischer JM, Lassmann H *et al.* (2010) Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **133**, 2983–98.
- Brand-Schieber E, Werner P, Iacobas DA *et al.* (2005) Connexin43, the Major Gap Junction Protein of Astrocytes, Is Down-Regulated in Inflamed White Matter in an Animal Model of Multiple Sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol.*, **80**, 798–808.
- Le Bras B, Chatzopoulou E, Heydon K *et al.* (2005) Oligodendrocyte development in the embryonic brain: the contribution of the plp lineage. *The International journal of developmental biology*, **49**, 209–20.
- Brenner S (2010) Sequences and consequences. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **365**, 207–12.
- Brink BP, Veerhuis R, Breij ECW *et al.* (2005) The pathology of multiple sclerosis is location-dependent: no significant complement activation is detected in purely cortical lesions. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **64**, 147–55.
- Brinkmann BG, Agarwal A, Sereda MW *et al.* (2008) Neuregulin-1/ErbB signaling serves distinct functions in myelination of the peripheral and central nervous system. *Neuron*, **59**, 581–95.
- Brodacki B, Staszewski J, Toczyłowska B *et al.* (2008) Serum interleukin (IL-2, IL-10, IL-6, IL-4), TNFalpha, and INFgamma concentrations are elevated in patients with atypical and idiopathic parkinsonism. *Neuroscience letters*, **441**, 158–62.
- Brosnan CF, Raine CS (2013) The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia*, **61**, 453–465.
- Brown GC, Bal-Price A (2003) Inflammatory neurodegeneration mediated by nitric oxide, glutamate, and mitochondria. *Molecular neurobiology*, **27**, 325–55.

- Brownell B, Hughes JT (1962) The distribution of plaques in the cerebrum in multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **25**, 315–20.
- Brück W, Bitsch A, Kolenda H *et al.* (1997) Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology. *Annals of neurology*, **42**, 783–93.
- Brück W, Kuhlmann T, Stadelmann C (2003) Remyelination in multiple sclerosis. *Journal of the Neurological Sciences*, **206**, 181–185.
- Brück W, Porada P, Poser S *et al.* (1995) Monocyte/macrophage differentiation in early multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*, **38**, 788–96.
- Brück W, Sommermeier N, Bergmann M *et al.* (1996) Macrophages in multiple sclerosis. *Immunobiology*, **195**, 588–600.
- Bsibsi M, Persoon-Deen C, Verwer R *et al.* (2006) Toll-like receptor 3 on adult human astrocytes triggers production of neuroprotective mediators. *Glia*, **53**, 688–695.
- Bunge M, Bunge R, Physiology C, York N (1961) Ultrastructural study of remyelination in an experimental lesion in adult cat spinal cord. *The Journal of Biophysical and Biochemical Cytology*, **10**, 67–94.
- Bush TG, Puvanachandra N, Horner CH *et al.* (1999) Leukocyte Infiltration, Neuronal Degeneration, and Neurite Outgrowth after Ablation of Scar-Forming, Reactive Astrocytes in Adult Transgenic Mice. *J Neurosci*, **23**, 297–308.
- Butovsky O, Ziv Y, Schwartz A *et al.* (2006) Microglia activated by IL-4 or IFN-gamma differentially induce neurogenesis and oligodendrogenesis from adult stem/progenitor cells. *Molecular and cellular neurosciences*, **31**, 149–60.
- Butte A (2002) The use and analysis of microarray data. *Nature reviews. Drug discovery*, **1**, 951–60.
- Cabarrocas J, Bauer J, Piaggio E, Liblau R, Lassmann H (2003) Effective and selective immune surveillance of the brain by MHC class I-restricted cytotoxic T lymphocytes. *European journal of immunology*, **33**, 1174–82.
- Cagnin A, Brooks DJ, Kennedy AM *et al.* (2001) In-vivo measurement of activated microglia in dementia. *Lancet*, **358**, 461–467.
- Calabrese M, Agosta F, Rinaldi F *et al.* (2009) Cortical lesions and atrophy associated with cognitive impairment in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Archives of neurology*, **66**, 1144–50.
- Calabrese M, Poretto V, Favaretto A *et al.* (2012) Cortical lesion load associates with progression of disability in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **135**, 2952–61.
- Calabrese M, Romualdi C, Poretto V *et al.* (2013) The changing clinical course of multiple sclerosis: A matter of gray matter. *Annals of neurology*, **74**, 76–83.
- Campagnoni AT, Pribyl M, Campagnoni CW *et al.* (1993) Structure and Developmental Regulation of GoZZi-mbp, a 105-Kilobase Gene That Encompasses the Myelin Basic Protein Gene and Is Expressed in Cells in the Oligodendrocyte Lineage in the Brain. *The Journal of biological chemistry*, **268**, 4930–4938.
- Campbell GR, Ziabreva I, Reeve AK *et al.* (2011) Mitochondrial DNA deletions and neurodegeneration in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, **69**, 481–92.
- Cao L, He C (2013) Polarization of macrophages and microglia in inflammatory demyelination. *Neuroscience bulletin*, **29**, 189–98.
- Cappellano G, Carecchio M, Fleetwood T *et al.* (2013) Immunity and inflammation in neurodegenerative diseases. *American journal of neurodegenerative disease*, **2**, 89–107.
- Caras I, Tucureanu C, Lerescu L *et al.* (2011) Influence of tumor cell culture supernatants on macrophage functional polarization: in vitro models of macrophage-tumor environment interaction. *Tumori*, **97**, 647–654.
- Cardona AE, Pioro EP, Sasse ME *et al.* (2006) Control of microglial neurotoxicity by the fractalkine receptor. *Nature neuroscience*, **9**, 917–24.
- Carnegie P (1971) Amino Acid Sequence of the Encephalitogenic Basic Protein from Human Myelin. *Biochem. J.*, **123**, 57–67.
- Carson MJ (2002) Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: functional implications for multiple sclerosis. *Glia*, **40**, 218–31.
- Carswell R (1838) *Pathological anatomy: illustrations of the elementary forms of disease*. London.
- Chaboub LS, Deneen B (2013) Astrocyte Form and Function in the Developing Central Nervous System. *Seminars in Pediatric Neurology*, **20**, 230–235.
- Challoner PB, Smith KT, Parker JD *et al.* (1995) Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **92**, 7440–4.
- Chandran S, Hunt D, Joannides A *et al.* (2008) Myelin repair: the role of stem and precursor cells in multiple sclerosis. *Philosophical transactions of the Royal Society of London. Series B, Biological sciences*, **363**, 171–83.
- Chang A, Staugaitis SM, Dutta R *et al.* (2012) Cortical remyelination: A new target for repair therapies in multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, **72**, 918–926.
- Charcot J-M (1865) Sclérose des cordons latéraux de la moelle épinière, chez une femme hystérique, atteinte de contracture permanente des quatre membres. *Bull Mem Soc Med Hop Paris II*, 24–35.
- Charles P, Hernandez MP, Stankoff B *et al.* (2000) Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **97**, 7585–90.

- Chen Y-A, Tripathi LP, Mizuguchi K (2011) TargetMine, an integrated data warehouse for candidate gene prioritisation and target discovery. *PLoS one*, **6**, e17844.
- Chen X, Winkler-Pickett RT, Carbonetti NH *et al.* (2006) Pertussis toxin as an adjuvant suppresses the number and function of CD4+CD25+ T regulatory cells. *European journal of immunology*, **36**, 671–80.
- Chiocchetti A, Comi C, Indelicato M *et al.* (2005) Osteopontin gene haplotypes correlate with multiple sclerosis development and progression. *Journal of neuroimmunology*, **163**, 172–8.
- Choi SR, Howell OW, Carassiti D *et al.* (2012) Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **135**, 2925–37.
- Ciccarelli O, Altmann DR, McLean MA *et al.* (2010a) Spinal cord repair in MS: does mitochondrial metabolism play a role? *Neurology*, **74**, 721–7.
- Ciccarelli O, Toosy AT, De Stefano N *et al.* (2010b) Assessing neuronal metabolism in vivo by modeling imaging measures. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **30**, 15030–3.
- Ciccarelli O, Wheeler-Kingshott CA, McLean MA *et al.* (2007) Spinal cord spectroscopy and diffusion-based tractography to assess acute disability in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **130**, 2220–31.
- Cohen AB, Neema M, Arora A *et al.* (2012) The relationships among MRI-defined spinal cord involvement, brain involvement, and disability in multiple sclerosis. *J Neuroimaging*, **22**, 122–128.
- Cohen-Adad J, Gauthier CJ, Brooks JCW *et al.* (2010) BOLD signal responses to controlled hypercapnia in human spinal cord. *NeuroImage*, **50**, 1074–84.
- Cohen-Adad J, Hoge RD, Leblond H *et al.* (2009) Investigations on spinal cord fMRI of cats under ketamine. *NeuroImage*, **44**, 328–39.
- Coles AJ, Cox A, Le Page E *et al.* (2006) The window of therapeutic opportunity in multiple sclerosis: evidence from monoclonal antibody therapy. *Journal of neurology*, **253**, 98–108.
- Colombo E, Cordiglieri C, Melli G *et al.* (2012) Stimulation of the neurotrophin receptor TrkB on astrocytes drives nitric oxide production and neurodegeneration. *The Journal of experimental medicine*, **209**, 521–35.
- Colton C, Wilcock D (2010) Assessing activation states in microglia. *CNS Neurol Disord Drug Targets*, **9**, 174–191.
- Coman I, Aigrot MS, Seilhean D *et al.* (2006) Nodal, paranodal and juxtaparanodal axonal proteins during demyelination and remyelination in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **129**, 3186–95.
- Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet*, **372**, 1502–17.
- Confavreux C, Aimard G, Devic M (1980) Course and prognosis of multiple sclerosis assessed by the computerized data processing of 349 patients. *Brain*, **103**, 281–300.
- Confavreux C, Compston A (2006) *The natural history of multiple sclerosis*, In: “*McAlpine’s Multiple Sclerosis. 4th edn.*” (A Compston, Ed.). London.
- Confavreux C, Vukusic S (2006) Natural history of multiple sclerosis: a unifying concept. *Brain : a journal of neurology*, **129**, 606–16.
- Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P (2003) Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: an amnesic process. *Brain*, **126**, 770–782.
- Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P (2000) Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, **343**, 1430–1438.
- Correale J, Villa A (2008) Isolation and characterization of CD8+ regulatory T cells in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, **195**, 121–34.
- Cotton F, Weiner HL, Jolesz FA, Guttmann CRG (2003) MRI contrast uptake in new lesions in relapsing-remitting MS followed at weekly intervals. *Neurology*, **60**, 640–6.
- Court FA, Hendriks WTJ, MacGillivray HD, Alvarez J, van Minnen J (2008) Schwann cell to axon transfer of ribosomes: toward a novel understanding of the role of glia in the nervous system. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **28**, 11024–9.
- Cunningham C (2013) Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. *Glia*, **61**, 71–90.
- Danbolt NC (2001) Glutamate uptake. *Progress in neurobiology*, **65**, 1–105.
- Daugherty DJ, Selvaraj V, Chechneva O V *et al.* (2013) A TSPO ligand is protective in a mouse model of multiple sclerosis. *EMBO molecular medicine*, **5**, 891–903.
- Davalos D, Grutzendler J, Yang G *et al.* (2005) ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nature neuroscience*, **8**, 752–8.
- Davalos D, Ryu JK, Merlini M *et al.* (2012) Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nature communications*, **3**, 1227.
- David S, Lacroix S (2003) Molecular approaches to spinal cord repair. *Annual review of neuroscience*, **26**, 411–40.
- Davis Q, Lambert S (1996) Molecular Composition of the Node of Ranvier: Identification of Ankyrin- binding Cell Adhesion Molecules Neurofascin (Mucin+/Third FNIII Domain-)and NrCAM at Nodal Axon Segments. , **135**, 1355–1367.
- Dawson JW (1916) The Histology of Disseminated Sclerosis. *Transactions of the Royal Society of Edinburgh*, **50**, 517–740.
- DeLuca GC, Williams K, Evangelou N, Ebers GC, Esiri MM (2006) The contribution of demyelination to axonal loss in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **129**, 1507–16.

- Depaz R, Granger B, Cournu-Rebeix I, Bouafia A, Fontaine B (2011) Genetics for understanding and predicting clinical progression in multiple sclerosis. *Revue neurologique*, **167**, 791–801.
- Dinarello CA (2005) Blocking IL-1 in systemic inflammation. *The Journal of experimental medicine*, **201**, 1355–9.
- Dissing-Olesen L, Ladeby R, Nielsen HH *et al.* (2007) Axonal lesion-induced microglial proliferation and microglial cluster formation in the mouse. *Neuroscience*, **149**, 112–22.
- Dong Y, Benveniste EN (2001) Immune Function of Astrocytes. *Glia*, **36**, 180–190.
- Drescher KM, Murray PD, Lin X, Carlino JA, Rodriguez M (2000) TGF-beta 2 reduces demyelination, virus antigen expression, and macrophage recruitment in a viral model of multiple sclerosis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **164**, 3207–13.
- Durafourt BA, Moore CS, Zammit DA *et al.* (2012) Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia*, **60**, 717–27.
- Durrenberger P, Fernando S, Kashefi S *et al.* (2010) Effects of antemortem and postmortem variables on human brain mRNA quality: a BrainNet Europe study. *J Neuropathol Exp Neurol.*, **69**, 70–81.
- Durrenberger PF, Webb L V, Sim MJW *et al.* (2012) Increased HLA-E expression in white matter lesions in multiple sclerosis. *Immunology*, **137**, 317–25.
- Dutta R, McDonough J, Yin X *et al.* (2006) Mitochondrial dysfunction as a cause of axonal degeneration in multiple sclerosis patients. *Annals of neurology*, **59**, 478–89.
- Dutta R, Trapp BD (2011) Mechanisms of Neuronal Dysfunction and Degeneration in Multiple Sclerosis. *Prog Neurobiol*, **93**, 1–12.
- Ebers GC (2008) Environmental factors and multiple sclerosis. *Lancet neurology*, **7**, 268–77.
- Ein-Dor L, Zuk O, Domany E (2006) Thousands of samples are needed to generate a robust gene list for predicting outcome in cancer. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **103**, 5923–8.
- Eisen MB, Spellman PT, Brown PO, Botstein D (1998) Cluster analysis and display of genome-wide expression patterns. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **95**, 14863–8.
- Ellrichmann G, Reick C, Saft C, Linker RA (2013) The role of the immune system in Huntington's disease. *Clinical & developmental immunology*, **2013**, 541259.
- Ellrichmann G, Thöne J, Lee D-H *et al.* (2012) Constitutive activity of NF-kappa B in myeloid cells drives pathogenicity of monocytes and macrophages during autoimmune neuroinflammation. *Journal of neuroinflammation*, **9**, 15.
- Elong Ngono A, Pettré S, Salou M *et al.* (2012) Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, **144**, 117–26.
- Emery B (2010) Regulation of oligodendrocyte differentiation and myelination. *Science (New York, N.Y.)*, **330**, 779–82.
- Engelhardt JI, Appel SH (1990) IgG reactivity in the spinal cord and motor cortex in amyotrophic lateral sclerosis. *Archives of neurology*, **47**, 1210–6.
- Eroglu C, Barres BA (2010) Regulation of synaptic connectivity by glia. *Nature*, **468**, 223–31.
- Evangelou N, DeLuca GC, Owens T, Esiri MM (2005) Pathological study of spinal cord atrophy in multiple sclerosis suggests limited role of local lesions. *Brain : a journal of neurology*, **128**, 29–34.
- Evangelou N, Esiri M, Smith S, Palace J, Matthews PM (2000) Quantitative pathological evidence for axonal loss in normal appearing white matter in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, **47**, 391–395.
- Falconar AKI, Martinez F (2011) The NS1 glycoprotein can generate dramatic antibody-enhanced dengue viral replication in normal out-bred mice resulting in lethal multi-organ disease. *PloS one*, **6**, e21024.
- Fantin A, Vieira JM, Gestri G *et al.* (2010) Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood*, **116**, 829–40.
- Farina C, Aloisi F, Meinl E (2007) Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends in immunology*, **28**, 138–45.
- Farina C, Krumbholz M, Giese T *et al.* (2005) Preferential expression and function of Toll-like receptor 3 in human astrocytes. *J Neurosci*, **25**, 12–19.
- Fatjó-Vilas M, Pomarol-Clotet E, Salvador R *et al.* (2012) Effect of the interleukin-1 β gene on dorsolateral prefrontal cortex function in schizophrenia: a genetic neuroimaging study. *Biological psychiatry*, **72**, 758–65.
- Faulkner JR, Herrmann JE, Woo MJ *et al.* (2004) Reactive astrocytes protect tissue and preserve function after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **24**, 2143–55.
- Fendrick SE, Xue Q-S, Streit WJ (2007) Formation of multinucleated giant cells and microglial degeneration in rats expressing a mutant Cu/Zn superoxide dismutase gene. *Journal of neuroinflammation*, **4**, 9.
- Fenrich KK, Weber P, Hocine M *et al.* (2012) Long-term in vivo imaging of normal and pathological mouse spinal cord with subcellular resolution using implanted glass windows. *The Journal of physiology*, **590**, 3665–75.
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH (1997) Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain : a journal of neurology*, **120**, 393–9.
- Filippi M, Bozzali M, Rovaris M *et al.* (2003) Evidence for widespread axonal damage at the earliest clinical stage of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **126**, 433–7.

- Filippi M, Horsfield MA, Adèr HJ *et al.* (1998) Guidelines for using quantitative measures of brain magnetic resonance imaging abnormalities in monitoring the treatment of multiple sclerosis. *Annals of neurology*, **43**, 499–506.
- Filippi M, Iannucci G, Cercignani M *et al.* (2000) A quantitative study of water diffusion in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter using echo-planar imaging. *Archives of neurology*, **57**, 1017–21.
- Filippi M, Rocca M. (2010) Dirty-Appearing White Matter: A Disregarded Entity in Multiple Sclerosis. *AJNR. American journal of neuroradiology*, **31**, 389–90.
- Filippi M, Rocca MA, Arnold DL *et al.* (2006) EFNS guidelines on the use of neuroimaging in the management of multiple sclerosis. *European journal of neurology: the official journal of the European Federation of Neurological Societies*, **13**, 313–25.
- Fischer HJ, Schweingruber N, Lühder F, Reichardt HM (2013a) The potential role of T cell migration and chemotaxis as targets of glucocorticoids in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Molecular and cellular endocrinology*, **380**, 99–107.
- Fischer MT, Wimmer I, Höftberger R *et al.* (2013b) Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain: a journal of neurology*, **136**, 1799–815.
- Fitzgerald DC, Ciric B, Touil T *et al.* (2007) Suppressive effect of IL-27 on encephalitogenic Th17 cells and the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, **179**, 3268–75.
- Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KHG (2010) T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clinical and experimental immunology*, **162**, 1–11.
- Fog T (1965) The topography of plaques in multiple sclerosis with special reference to cerebral plaques. *Acta neurologica Scandinavica. Supplementum*, **15**, 1–161.
- Foucher ED, Blanchard S, Preisser L *et al.* (2013) IL-34 induces the differentiation of human monocytes into immunosuppressive macrophages. antagonistic effects of GM-CSF and IFN γ . *PloS one*, **8**, e56045.
- Franklin RJ, Crang AJ, Blakemore WF (1991) Transplanted type-1 astrocytes facilitate repair of demyelinating lesions by host oligodendrocytes in adult rat spinal cord. *Journal of neurocytology*, **20**, 420–30.
- Franklin RJM, Ffrench-Constant C (2008) Remyelination in the CNS: from biology to therapy. *Nature reviews. Neuroscience*, **9**, 839–55.
- Freund P, Wheeler-Kingshott C, Jackson J *et al.* (2010) Recovery after spinal cord relapse in multiple sclerosis is predicted by radial diffusivity. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, **16**, 1193–202.
- Friese MA, Fugger L (2009) Pathogenic CD8(+) T cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, **66**, 132–41.
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A *et al.* (2009) The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain: a journal of neurology*, **132**, 1175–89.
- Fritzsche B, Haas J, König F *et al.* (2011) Intracerebral human regulatory T cells: analysis of CD4+ CD25+ FOXP3+ T cells in brain lesions and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients. *PloS one*, **6**, e17988.
- Froger N, Orellana JA, Calvo C-F *et al.* (2010) Inhibition of cytokine-induced connexin43 hemichannel activity in astrocytes is neuroprotective. *Molecular and cellular neurosciences*, **45**, 37–46.
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple sclerosis—the plaque and its pathogenesis. *The New England journal of medicine*, **354**, 942–55.
- Fromont A, Binquet C, Clerc L, Moreau T (2009) Epidemiology of multiple sclerosis: The special situation in France. *Rev Neurol (Paris)*, **165**, 671–675.
- Fromont A, Binquet C, Sauleau EA *et al.* (2010) Geographic variations of multiple sclerosis in France. *Brain: a journal of neurology*, **133**, 1889–99.
- Fromont A, Binquet C, Sauleau EA *et al.* (2012) National estimate of multiple sclerosis incidence in France (2001–2007). *Multiple Sclerosis Journal*, **18**, 1108–1115.
- Fu L, Matthews PM, De Stefano N *et al.* (1998) Imaging axonal damage of normal-appearing white matter in multiple sclerosis. *Brain: a journal of neurology*, **121** (Pt 1), 103–13.
- Fujita A, Gomes LR, Sato JR *et al.* (2008) Multivariate gene expression analysis reveals functional connectivity changes between normal/tumoral prostates. *BMC systems biology*, **2**, 106.
- Funfschilling U, Supplie LM, Mahad D *et al.* (2013) Glycolytic oligodendrocytes maintain myelin and long-term axonal integrity Ursula. *Nature*, **485**, 517–521.
- Gao F, Chen D, Hu Q, Wang G (2013) Rotenone directly induces BV2 cell activation via the p38 MAPK pathway. *PloS one*, **8**, e72046.
- Gasque P, Dean YD, McGreal EP, VanBeek J, Morgan BP (2000) Complement components of the innate immune system in health and disease in the CNS. *Immunopharmacology*, **49**, 171–86.
- Ge Y, Grossman RI, Babb JS, He J, Mannon LJ (2003) Dirty-appearing white matter in multiple sclerosis: volumetric MR imaging and magnetization transfer ratio histogram analysis. *AJNR. American journal of neuroradiology*, **24**, 1935–40.
- Ge S, Shrestha B, Paul D *et al.* (2012) The CCL2 synthesis inhibitor bindarit targets cells of the neurovascular unit, and suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroinflammation*, **9**, 171.
- Gehrmann J, Banati RB, Kreutzberg GW (1993) Microglia in the immune surveillance of the brain: human microglia constitutively express HLA-DR molecules. *Journal of neuroimmunology*, **48**, 189–98.

- Geissmann F, Gordon S, Hume DA, Mowat AM, Randolph GJ (2010) Unravelling mononuclear phagocyte heterogeneity. *Nature reviews. Immunology*, **10**, 453–60.
- Gerhauser I, Hansmann F, Puff C *et al.* (2012) Theiler's murine encephalomyelitis virus induced phenotype switch of microglia in vitro. *Journal of neuroimmunology*, **252**, 49–55.
- Geurts JJG, Stys PK, Minagar A, Amor S, Zivadinov R (2009) Gray matter pathology in (chronic) MS: modern views on an early observation. *Journal of the neurological sciences*, **282**, 12–20.
- Geurts JJG, Wolswijk G, Bö L *et al.* (2003) Altered expression patterns of group I and II metabotropic glutamate receptors in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **126**, 1755–66.
- Giaume C, Leybaert L, C Naus C, C Sáez J (2013) Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: properties, pharmacology, and roles. *Frontiers in pharmacology*, **4**, 88.
- Ginhoux F, Greter M, Leboeuf M *et al.* (2010) Fate mapping analysis reveals that adult microglia derive from primitive macrophages. *Science (New York, N.Y.)*, **330**, 841–5.
- Goldmann T, Prinz M (2013) Role of Microglia in CNS Autoimmunity 1. *Clin Dev Immunol.*
- González-Scarano F, Baltuch G (1999) Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases. *Annual review of neuroscience*, **22**, 219–40.
- Goubard V (2010) Interactions neurone-glie et transfert des informations cortico-striatales.
- Goudriaan A, de Leeuw C, Ripke S *et al.* (2013) Specific Glial Functions Contribute to Schizophrenia Susceptibility. *Schizophrenia bulletin*.
- Gourraud P-A, Harbo HF, Hauser SL, Baranzini SE (2012) The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review. *Immunological reviews*, **248**, 87–103.
- Graumann U, Reynolds R, Steck AJ, Schaeren-Wiemers N (2003) Molecular changes in normal appearing white matter in multiple sclerosis are characteristic of neuroprotective mechanisms against hypoxic insult. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, **13**, 554–73.
- Gravel M, Peterson J, Yong VW *et al.* (1996) Overexpression of 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in transgenic mice alters oligodendrocyte development and produces aberrant myelination. *Molecular and cellular neurosciences*, **7**, 453–66.
- Gray E, Thomas TL, Betmouni S, Scolding N, Love S (2008) Elevated activity and microglial expression of myeloperoxidase in demyelinated cerebral cortex in multiple sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, **18**, 86–95.
- De Groot CJ, Bergers E, Kamphorst W *et al.* (2001) Post-mortem MRI-guided sampling of multiple sclerosis brain lesions: increased yield of active demyelinating and (p)reactive lesions. *Brain : a journal of neurology*, **124**, 1635–45.
- Gunnarsson M, Malmeström C, Axelsson M *et al.* (2011) Axonal damage in relapsing multiple sclerosis is markedly reduced by natalizumab. *Annals of neurology*, **69**, 83–9.
- Guzzo C, Ayer A, Basta S, Banfield BW, Gee K (2012) IL-27 enhances LPS-induced proinflammatory cytokine production via upregulation of TLR4 expression and signaling in human monocytes. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **188**, 864–73.
- Habek M, Brinar V, Borovecki F (2010) Genes associated with multiple sclerosis: 15 and counting. *Expert Rev Mol Diagn*, **10**, 857–861.
- Hafler DA, Compston A, Sawcer S *et al.* (2007) Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *The New England journal of medicine*, **357**, 851–62.
- Halassa MM, Fellin T, Takano H, Dong J-H, Haydon PG (2007) Synaptic islands defined by the territory of a single astrocyte. *The Journal of neuroscience*, **27**, 6473–7.
- Hamby ME, Coppola G, Ao Y *et al.* (2012) Inflammatory mediators alter the astrocyte transcriptome and calcium signaling elicited by multiple G-protein-coupled receptors. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 14489–510.
- Hamby ME, Sofroniew M V (2010) Reactive astrocytes as therapeutic targets for CNS disorders. *Neurotherapeutics : the journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics*, **7**, 494–506.
- Hamilton NB, Attwell D (2010) Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nature reviews. Neuroscience*, **11**, 227–38.
- Handel AE, Giovannoni G, Ebers GC, Ramagopalan S V (2010) Environmental factors and their timing in adult-onset multiple sclerosis. *Nature reviews. Neurology*, **6**, 156–66.
- Hanisch U-K (2013) Functional diversity of microglia - how heterogeneous are they to begin with? *Frontiers in cellular neuroscience*, **7**, 65.
- Hanisch U-K, Kettenmann H (2007) Microglia: active sensor and versatile effector cells in the normal and pathologic brain. *Nature neuroscience*, **10**, 1387–94.
- Harp CT, Ireland S, Davis LS *et al.* (2010) Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4(+) T-cell proliferation and IFN- γ production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *European journal of immunology*, **40**, 2942–56.
- Hauser SL, Waubant E, Arnold DL *et al.* (2008) B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, **358**, 676–88.

- Hedström AK, Sundqvist E, Bäärnhielm M *et al.* (2011) Smoking and two human leukocyte antigen genes interact to increase the risk for multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **134**, 653–64.
- Hemmer B, Cepok S, Nessler S, Sommer N (2002) Pathogenesis of multiple sclerosis: an update on immunology. *Current opinion in neurology*, **15**, 227–31.
- Hemmer B, Hartung H-P (2007) Toward the development of rational therapies in multiple sclerosis: what is on the horizon? *Annals of neurology*, **62**, 314–26.
- Henderson APD, Barnett MH, Parratt JDE, Prineas JW (2009) Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Annals of neurology*, **66**, 739–53.
- Hendrickx DA, Schuurman KG, van Draanen M, Hamann J, Huitinga I (2014) Enhanced uptake of multiple sclerosis-derived myelin by THP-1 macrophages and primary human microglia. *Journal of Neuroinflammation*, **11**, 64.
- Heneka MT, O'Banion MK (2007) Inflammatory processes in Alzheimer's disease. *Journal of neuroimmunology*, **184**, 69–91.
- Heppner FL, Greter M, Marino D *et al.* (2005) Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis. *Nature medicine*, **11**, 146–52.
- Hernández-Pedro NY, Espinosa-Ramirez G, de la Cruz VP, Pineda B, Sotelo J (2013) Initial immunopathogenesis of multiple sclerosis: innate immune response. *Clinical & developmental immunology*, **2013**, 413465.
- Hirase T, Hara H, Miyazaki Y *et al.* (2013) Interleukin 27 inhibits atherosclerosis via immunoregulation of macrophages in mice. *American journal of physiology. Heart and circulatory physiology*, **305**, H420–9.
- Hirase H, Qian L, Barthó P, Buzsáki G (2004) Calcium dynamics of cortical astrocytic networks in vivo. *PLoS biology*, **2**, E96.
- Hirsch EC, Vyas S, Hunot S (2012) Neuroinflammation in Parkinson's disease. *Parkinsonism & related disorders*, **18 Suppl 1**, S210–2.
- Höftberger R, Fink S, Aboul-Enein F *et al.* (2010) Tubulin polymerization promoting protein (TPPP/p25) as a marker for oligodendroglial changes in multiple sclerosis. *Glia*, **58**, 1847–57.
- Holley JE, Gveric D, Newcombe J, Cuzner ML, Gutowski NJ (2003) Astrocyte characterization in the multiple sclerosis glial scar. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **29**, 434–444.
- Horsfield MA, Sala S, Neema M *et al.* (2010) Rapid semi-automatic segmentation of the spinal cord from magnetic resonance images: application in multiple sclerosis. *NeuroImage*, **50**, 446–55.
- Van Horsen J, Singh S, van der Pol S *et al.* (2012) Clusters of activated microglia in normal-appearing white matter show signs of innate immune activation. *Journal of neuroinflammation*, **9**, 156.
- Hoshiko M, Arnoux I, Avignone E, Yamamoto N, Audinat E (2012) Deficiency of the microglial receptor CX3CR1 impairs postnatal functional development of thalamocortical synapses in the barrel cortex. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **32**, 15106–11.
- Hövelmeyer N, Hao Z, Kranidioti K *et al.* (2005) Apoptosis of oligodendrocytes via Fas and TNF-R1 is a key event in the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*, **175**, 5875–84.
- Howell OW, Reeves CA, Nicholas R *et al.* (2011) Meningeal inflammation is widespread and linked to cortical pathology in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **134**, 2755–71.
- Howell OW, Rundle JL, Garg A *et al.* (2010) Activated Microglia Mediate Axoglial Disruption That Contributes to Axonal Injury in Multiple Sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology*, **69**, 1017–33.
- Huang JK, Jarjour AA, Nait Oumesmar B *et al.* (2011) Retinoid X receptor gamma signaling accelerates CNS remyelination. *Nature neuroscience*, **14**, 45–53.
- Huizinga R, van der Star BJ, Kipp M *et al.* (2012) Phagocytosis of neuronal debris by microglia is associated with neuronal damage in multiple sclerosis. *Glia*, **60**, 422–31.
- IMSGC (2010) IL12A, MPHOSPH9/CDK2AP1 and RGS1 are novel multiple sclerosis susceptibility loci. *Genes Immun.*, **11**, 397–405.
- Ingle GT, Stevenson VL, Miller DH, Thompson AJ (2003) Primary progressive multiple sclerosis: a 5-year clinical and MR study. *Brain : a journal of neurology*, **126**, 2528–36.
- Inoue H, Sawada M, Ryo A *et al.* (1999) Serial analysis of gene expression in a microglial cell line. *Glia*, **28**, 265–71.
- Ip CW, Kroner A, Crocker PR, Nave K-A, Martini R (2007) Sialoadhesin deficiency ameliorates myelin degeneration and axonopathic changes in the CNS of PLP overexpressing mice. *Neurobiology of disease*, **25**, 105–11.
- Irvine K a, Blakemore WF (2008) Remyelination protects axons from demyelination-associated axon degeneration. *Brain : a journal of neurology*, **131**, 1464–77.
- Ito H, Yamamoto N, Arima H *et al.* (2006) Interleukin-1beta induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor-kappaB pathway in rat astrocytes. *Journal of neurochemistry*, **99**, 107–18.
- Jacob A, Weinshenker BG (2008) An Approach to the Diagnosis of Acute Transverse Myelitis. *Seminars in Neurology*, **28**, 105–120.
- Jalil MA, Begum L, Contreras L *et al.* (2005) Reduced N-acetylaspartate levels in mice lacking aralar, a brain- and muscle-type mitochondrial aspartate-glutamate carrier. *The Journal of biological chemistry*, **280**, 31333–9.
- Jang Y-S, Kim J-H, Seo G-Y, Kim P-H (2011) TGF-β1 stimulates mouse macrophages to express APRIL through Smad and p38MAPK/CREB pathways. *Molecules and cells*, **32**, 251–5.

- Jankowski M, Kopiński P, Goc A (2010) Interleukin-27: biological properties and clinical application. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, **58**, 417–25.
- Jellinger KA (2010) Basic mechanisms of neurodegeneration: a critical update. *Journal of cellular and molecular medicine*, **14**, 457–87.
- Ji Q, Perchellet A, Goverman JM (2010) Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nature immunology*, **11**, 628–34.
- Jilek S, Schlupe M, Rossetti AO *et al.* (2007) CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, **123**, 105–13.
- John G, Lee S, Brosnan C (2003) Cytokines: powerful regulators of glial cell activation. *Neuroscientist*, **9**, 10–22.
- Jordan BR (2010) Is there a niche for DNA microarrays in molecular diagnostics? *Expert review of molecular diagnostics*, **10**, 875–82.
- Juhler M, Barry DI, Offner H *et al.* (1984) Blood-brain and blood-spinal cord barrier permeability during the course of experimental allergic encephalomyelitis in the rat. *Brain research*, **302**, 347–55.
- Junker A, Ivanidze J, Malotka J *et al.* (2007) Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain : a journal of neurology*, **130**, 2789–99.
- Karampekios S, Papanikolaou N, Papadaki E *et al.* (2005) Quantification of magnetization transfer rate and native T1 relaxation time of the brain: correlation with magnetization transfer ratio measurements in patients with multiple sclerosis. *Neuroradiology*, **47**, 189–96.
- Kato T, Hirano A, Llana J, Dembitzer H (1987) Neuropathology of acquired immune deficiency syndrome (AIDS) in 53 autopsy cases with particular emphasis on microglial nodules and multinucleated giant cells. *Acta Neuropathologica*, **73**, 287–294.
- Kawamata T, Akiyama H, Yamada T, McGeer PL (1992) Immunologic reactions in amyotrophic lateral sclerosis brain and spinal cord tissue. *The American journal of pathology*, **140**, 691–707.
- Kerfoot SM, Long EM, Hickey MJ *et al.* (2004) TLR4 contributes to disease-inducing mechanisms resulting in central nervous system autoimmune disease. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **173**, 7070–7.
- Kerschensteiner M, Bareyre FM, Buddeberg BS *et al.* (2004) Remodeling of axonal connections contributes to recovery in an animal model of multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*, **200**, 1027–38.
- Khonsari RH, Calvez V (2007) The origins of concentric demyelination: self-organization in the human brain. *PloS one*, **2**, e150.
- Kidd D, Barkhof F, McConnell R *et al.* (1999) Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **122** (Pt 1), 17–26.
- Kierdorf K, Erny D, Goldmann T *et al.* (2013) Microglia emerge from erythromyeloid precursors via Pu.1- and Irf8-dependent pathways. *Nature neuroscience*, **16**, 273–80.
- Kipp M, Clarner T, Dang J, Copray S, Beyer C (2009) The cuprizone animal model: new insights into an old story. *Acta neuropathologica*, **118**, 723–36.
- Klein JP, Arora A, Neema M *et al.* (2011) A 3T MR imaging investigation of the topography of whole spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *AJNR. American journal of neuroradiology*, **32**, 1138–42.
- Kooi E-J, Strijbis EMM, van der Valk P, Geurts JJG (2012) Heterogeneity of cortical lesions in multiple sclerosis: clinical and pathologic implications. *Neurology*, **79**, 1369–76.
- Kornek B, Storch MK, Bauer J *et al.* (2001) Distribution of a calcium channel subunit in dystrophic axons in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain : a journal of neurology*, **124**, 1114–24.
- Kornek B, Storch MK, Weissert R *et al.* (2000) Multiple sclerosis and chronic autoimmune encephalomyelitis: a comparative quantitative study of axonal injury in active, inactive, and remyelinated lesions. *The American journal of pathology*, **157**, 267–76.
- Kotter MR, Li W-W, Zhao C, Franklin RJM (2006) Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *The Journal of neuroscience*, **26**, 328–32.
- Kozinska D, Holland CM, Krissian K, Westin C-F, Guttmann CRG (2004) A method for the analysis of the geometrical relationship between white matter pathology and the vascular architecture of the brain. *NeuroImage*, **22**, 1671–8.
- Kren L, Muckova K, Lzicarova E *et al.* (2010) Production of immune-modulatory nonclassical molecules HLA-G and HLA-E by tumor infiltrating amoeboid microglia/macrophages in glioblastomas: a role in innate immunity? *Journal of neuroimmunology*, **220**, 131–5.
- Kreymborg K, Etzensperger R, Dumoutier L *et al.* (2007) IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **179**, 8098–104.
- Krumbholz M, Theil D, Cepok S *et al.* (2006) Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain : a journal of neurology*, **129**, 200–11.
- Krumbholz M, Theil D, Derfuss T *et al.* (2005) BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma. *The Journal of experimental medicine*, **201**, 195–200.
- Kuhlmann T, Lassmann H, Brück W (2008a) Diagnosis of inflammatory demyelination in biopsy specimens: a practical approach. *Acta neuropathologica*, **115**, 275–87.
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Brück W (2002) Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain : a journal of neurology*, **125**, 2202–12.

- Kuhlmann T, Miron V, Cui Q *et al.* (2008b) Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **131**, 1749–58.
- Kuhn A, Thu D, Waldvogel HJ, Faull RLM, Luthi-Carter R (2011) Population-specific expression analysis (PSEA) reveals molecular changes in diseased brain. *Nature methods*, **8**, 945–7.
- Kumar-Singh S (2011) Progranulin and TDP-43: mechanistic links and future directions. *Journal of molecular neuroscience*, **45**, 561–73.
- Kurtzke J (1983) Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology*, **33**, 1444–1452.
- Kutzelnigg A, Lucchinetti CF, Stadelmann C *et al.* (2005) Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **128**, 2705–12.
- Labbadia J, Morimoto RI (2013) Huntington's disease: underlying molecular mechanisms and emerging concepts. *Trends in biochemical sciences*, **38**, 378–85.
- LaCrosse A, Olive M (2013) Neuropeptide systems and schizophrenia. *CNS Neurol Disord Drug Targets.*, **12**, 619–632.
- Laplaud D-A, Berthelot L, Miquieu P *et al.* (2006) Serial blood T cell repertoire alterations in multiple sclerosis patients; correlation with clinical and MRI parameters. *Journal of neuroimmunology*, **177**, 151–60.
- Laplaud D-A, Ruiz C, Wiertlewski S *et al.* (2004) Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution. *Brain : a journal of neurology*, **127**, 981–95.
- Lassmann H (2007) Multiple sclerosis: is there neurodegeneration independent from inflammation? *Journal of the neurological sciences*, **259**, 3–6.
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF (2007) The immunopathology of multiple sclerosis: an overview. *Brain pathology*, **17**, 210–8.
- Lassmann H, van Horssen J (2011) The molecular basis of neurodegeneration in multiple sclerosis. *FEBS letters*, **585**, 3715–23.
- Lassmann H, van Horssen J, Mahad D (2012) Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nature reviews. Neurology*, **8**, 647–56.
- Laule C, Vavasour IM, Leung E *et al.* (2011) Pathological basis of diffusely abnormal white matter: insights from magnetic resonance imaging and histology. *Multiple Sclerosis*, **17**, 144–150.
- Lawson L., Perry VH, Dri P, Gordon S (1990) Heterogeneity in the distribution and morphology of microglia in the normal adult mouse brain. *Neuroscience*, **39**, 151–170.
- Lee B, Sharron M, Montaner LJ, Weissman D, Doms RW (1999) Quantification of CD4, CCR5, and CXCR4 levels on lymphocyte subsets, dendritic cells, and differentially conditioned monocyte-derived macrophages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **96**, 5215–20.
- Lelli A, Gervais A, Colin C *et al.* (2013) The NADPH oxidase Nox2 regulates VEGFR1/CSF-1R-mediated microglial chemotaxis and promotes early postnatal infiltration of phagocytes in the subventricular zone of the mouse cerebral cortex. *Glia*, **61**, 1542–1555.
- Lennon VA, Wingerchuk DM, Kryzer TJ *et al.* (2004) A serum autoantibody marker of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Lancet*, **364**, 2106–12.
- Leray E, Yaouanq J, Le Page E *et al.* (2010) Evidence for a two-stage disability progression in multiple sclerosis. *Brain*, **133**, 1900–13.
- Levy L, Lehre K, Walaas S, Storm-Mathisen J, Danbolt N (1995) Down-regulation of glial glutamate transporters after glutamatergic denervation in the rat brain. *Eur J Neurosci*, **7**, 2036–2041.
- Li J, Baud O, Vartanian T, Volpe JJ, Rosenberg PA (2005) Peroxynitrite generated by inducible nitric oxide synthase and NADPH oxidase mediates microglial toxicity to oligodendrocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **102**, 9936–41.
- Li H, Cuzner ML, Newcombe J (1996) Microglia-derived macrophages in early multiple sclerosis plaques. *Neuropathology and Applied Neurobiology*, **22**, 207–215.
- Li Y, Du X-F, Liu C-S, Wen Z-L, Du J-L (2012) Reciprocal regulation between resting microglial dynamics and neuronal activity in vivo. *Developmental cell*, **23**, 1189–202.
- Li M, Ransohoff RM (2008) Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: A migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol*, **84**, 116–131.
- Li C, Tropak MB, Gerlai R *et al.* (1994) Myelination in the absence of myelin-associated glycoprotein. *Nature*, **369**, 747–750.
- Liao B, Zhao W, Beers DR, Henkel JS, Appel SH (2012) Transformation from a neuroprotective to a neurotoxic microglial phenotype in a mouse model of ALS. *Experimental neurology*, **237**, 147–52.
- Liberto CM, Albrecht PJ, Herx LM, Yong VW, Levison SW (2004) Pro-regenerative properties of cytokine-activated astrocytes. *Journal of neurochemistry*, **89**, 1092–100.
- Lin H, Lee E, Hestir K *et al.* (2008) Discovery of a cytokine and its receptor by functional screening of the extracellular proteome. *Science (New York, N.Y.)*, **320**, 807–11.
- Liu Y-H, Zeng F, Wang Y-R *et al.* (2013) Immunity and Alzheimer's disease: immunological perspectives on the development of novel therapies. *Drug discovery today*, **18**, 1212–20.

- Locatelli G, Wörtge S, Buch T *et al.* (2012) Primary oligodendrocyte death does not elicit anti-CNS immunity. *Nature neuroscience*, **15**, 543–50.
- Loda E, Balabanov R (2012) Interferon regulatory factor 1 regulation of oligodendrocyte injury and inflammatory demyelination. *Rev Neurosci*, **23**, 145–152.
- Van Loo G, De Lorenzi R, Schmidt H *et al.* (2006) Inhibition of transcription factor NF-kappaB in the central nervous system ameliorates autoimmune encephalomyelitis in mice. *Nature immunology*, **7**, 954–61.
- Losseff NA, Kingsley DP, McDonald WI, Miller DH, Thompson AJ (1996) Clinical and magnetic resonance imaging predictors of disability in primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, **1**, 218–22.
- Losseff N, Miller D (1998) Measures of brain and spinal cord atrophy in multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **64**, 102–105.
- Lovas G, Szilágyi N, Majtényi K, Palkovits M, Komoly S (2000) Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain : a journal of neurology*, **123**, 308–17.
- Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK (2011) Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochimica et biophysica acta*, **1812**, 246–51.
- Lubetzki C, Demerens C, Anglade P *et al.* (1993) Even in culture, oligodendrocytes myelinate solely axons. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **90**, 6820–4.
- Lublin F, Reingold S (1996) Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis. *Neurology*, **46**, 907–911.
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J *et al.* (1999) A quantitative analysis of oligodendrocytes in multiple sclerosis lesions. A study of 113 cases. *Brain*, **122**, 2279–95.
- Lucchinetti C, Brück W, Parisi J *et al.* (2000) Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination. *Annals of neurology*, **47**, 707–17.
- Lucchinetti CF, Mandler RN, McGavern D *et al.* (2002) A role for humoral mechanisms in the pathogenesis of Devic's neuromyelitis optica. *Brain : a journal of neurology*, **125**, 1450–61.
- Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF *et al.* (2011) Inflammatory Cortical Demyelination in Early Multiple Sclerosis. *New England Journal of Medicine*, **365**, 2188–2197.
- Lucin KM, Wyss-Coray T (2009) Immune activation in brain aging and neurodegeneration: too much or too little. *Neuron*, **64**, 110–122.
- Ludwin SK (1978) Central nervous system demyelination and remyelination in the mouse: an ultrastructural study of cuprizone toxicity. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **39**, 597–612.
- Ludwin SK, Johnson ES (1981) Evidence for a “dying-back” gliopathy in demyelinating disease. *Annals of neurology*, **9**, 301–5.
- Lundgaard I, Osorio M, Kress B, Sanggaard S, Nedergaard M (2014) White matter astrocytes in health and disease. *Neuroscience*.
- Lycklama A, Nijeholt GJ, Barkhof F *et al.* (1997) MR of the spinal cord in multiple sclerosis: relation to clinical subtype and disability. *AJNR. American journal of neuroradiology*, **18**, 1041–8.
- Lyman M, Lloyd DG, Ji X, Vizcaychipi MP, Ma D (2013) Neuroinflammation: The role and consequences. *Neuroscience research*, 1–12.
- Lysandropoulos AP, Jaquíery E, Jilek S *et al.* (2011) Vitamin D has a direct immunomodulatory effect on CD8+ T cells of patients with early multiple sclerosis and healthy control subjects. *Journal of neuroimmunology*, **233**, 240–4.
- Mack CL, Vanderlugt-Castaneda CL, Neville KL, Miller SD (2003) Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis. *Journal of Neuroimmunology*, **144**, 68–79.
- Maeda A, Sobel RA (1996) Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **55**, 300–9.
- Magalon K, Zimmer C, Cayre M *et al.* (2012) Olesoxime accelerates myelination and promotes repair in models of demyelination. *Annals of neurology*, **71**, 213–26.
- Magistretti PJ, Pellerin L (1999) Astrocytes Couple Synaptic Activity to Glucose Utilization in the Brain. *News in physiological sciences : an international journal of physiology produced jointly by the International Union of Physiological Sciences and the American Physiological Society*, **14**, 177–182.
- Magliozzi R, Howell OW, Reeves C *et al.* (2010) A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, **68**, 477–93.
- Magliozzi R, Howell O, Vora A *et al.* (2007) Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain : a journal of neurology*, **130**, 1089–104.
- Magliozzi R, Serafini B, Rosicarelli B *et al.* (2013) B-cell enrichment and Epstein-Barr virus infection in inflammatory cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **72**, 29–41.

- Magnus T, Schreiner B, Korn T *et al.* (2005) Microglial expression of the B7 family member B7 homolog 1 confers strong immune inhibition: implications for immune responses and autoimmunity in the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **25**, 2537–46.
- Mahad DJ, Ziabreva I, Campbell G *et al.* (2009) Mitochondrial changes within axons in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **132**, 1161–74.
- Malide D, Davies-Hill TM, Levine M, Simpson I a (1998) Distinct localization of GLUT-1, -3, and -5 in human monocyte-derived macrophages: effects of cell activation. *The American journal of physiology*, **274**, E516–26.
- Mallat M, Marín-Teva JL, Chéret C (2005) Phagocytosis in the developing CNS: more than clearing the corpses. *Current opinion in neurobiology*, **15**, 101–7.
- Mameli G, Astone V, Arru G *et al.* (2007) Brains and peripheral blood mononuclear cells of multiple sclerosis (MS) patients hyperexpress MS-associated retrovirus/HERV-W endogenous retrovirus, but not Human herpesvirus 6. *The Journal of general virology*, **88**, 264–74.
- Man S, Tucky B, Cotleur A *et al.* (2012) CXCL12-Induced Monocyte-Endothelial Interactions Promote Lymphocyte Transmigration Across an in Vitro Blood-Brain Barrier. *Sci Transl Med*, **4**, 1–18.
- Mantovani A, Sica A, Locati M (2005) Macrophage polarization comes of age. *Immunity*, **23**, 344–6.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S *et al.* (2004) The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends in immunology*, **25**, 677–86.
- Mantovani A, Sozzani S, Locati M, Allavena P, Sica A (2002) Macrophage polarization: tumor-associated macrophages as a paradigm for polarized M2 mononuclear phagocytes. *Trends in immunology*, **23**, 549–55.
- Marignier R, Nicolle A, Watrin C *et al.* (2010) Oligodendrocytes are damaged by neuromyelitis optica immunoglobulin G via astrocyte injury. *Brain : a journal of neurology*, **133**, 2578–91.
- Marik C, Felts PA, Bauer J, Lassmann H, Smith KJ (2007) Lesion genesis in a subset of patients with multiple sclerosis : a role for innate immunity ? *Brain*, **130**, 2800–2815.
- Markoullis K, Sargiannidou I, Schiza N *et al.* (2012) Gap junction pathology in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter. *Acta neuropathologica*, **123**, 873–86.
- Martinez FO, Sica A, Mantovani A, Locati M (2008) Macrophage activation and polarization. *Frontiers in bioscience : a journal and virtual library*, **13**, 453–61.
- Mason JL, Suzuki K, Chaplin DD, Matsushima GK (2001) Interleukin-1 beta Promotes Repair of the CNS. *The Journal of neuroscience*, **21**, 7046–7052.
- Mathey EK, Derfuss T, Storch MK *et al.* (2007) Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury. *The Journal of experimental medicine*, **204**, 2363–72.
- Matyash V, Kettenmann H (2010) Heterogeneity in astrocyte morphology and physiology. *Brain research reviews*, **63**, 2–10.
- McDonald WI, Compston A, Edan G *et al.* (2001) Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis. *Annals of neurology*, **50**, 121–7.
- McGeer P, Itagaki S, Boyes B, McGeer E (1988) Reactive microglia are positive for HLA-DR in the substantia nigra of Parkinson's and Alzheimer's disease brains. *Neurology*, **38**, 1285–1291.
- McKinnon C, Tabrizi SJ (2014) The Ubiquitin-Proteasome System in Neurodegeneration. *Antioxidants & redox signaling*, **00**, 1–20.
- McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD (2005) Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nature medicine*, **11**, 335–9.
- Mecha M, Feliú A, Carrillo-Salinas FJ, Mestre L, Guaza C (2013) Mobilization of progenitors in the subventricular zone to undergo oligodendrogenesis in the Theiler's virus model of multiple sclerosis: implications for remyelination at lesions sites. *Experimental neurology*, **250**, 348–52.
- Medawar PB (1948) Immunity to homologous grafted skin; the fate of skin homografts transplanted to the brain, to subcutaneous tissue, and to the anterior chamber of the eye. *British journal of experimental pathology*, **29**, 58–69.
- Meier U-C, Giovannoni G, Tzartos JS, Khan G (2012) Translational Mini-Review Series on B cell subsets in disease. B cells in multiple sclerosis: drivers of disease pathogenesis and Trojan horse for Epstein-Barr virus entry to the central nervous system? *Clinical and experimental immunology*, **167**, 1–6.
- Merson TD, Binder MD, Kilpatrick TJ (2010) Role of cytokines as mediators and regulators of microglial activity in inflammatory demyelination of the CNS. *Neuromolecular medicine*, **12**, 99–132.
- Mi S, Pepinsky RB, Cadavid D (2013) Blocking LINGO-1 as a therapy to promote CNS repair: from concept to the clinic. *CNS drugs*, **27**, 493–503.
- Michiels T, Brahic M (2012) La SEP est-elle une maladie virale? In: *La sclérose en plaques* (ed Moreau T), pp. 17–30. ARSEP fondation.
- Mikita J, Dubourdiou-Cassagno N, Deloire M *et al.* (2011) Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Multiple Sclerosis*, **17**, 2–15.
- Mildner A, Schmidt H, Nitsche M *et al.* (2007) Microglia in the adult brain arise from Ly-6ChiCCR2+ monocytes only under defined host conditions. *Nature neuroscience*, **10**, 1544–53.
- Miller BJ, Buckley P, Seabolt W, Mellor A, Kirkpatrick B (2011) Meta-analysis of cytokine alterations in schizophrenia: clinical status and antipsychotic effects. *Biological psychiatry*, **70**, 663–71.

- Miller DH, Thompson a J, Filippi M (2003) Magnetic resonance studies of abnormalities in the normal appearing white matter and grey matter in multiple sclerosis. *Journal of neurology*, **250**, 1407–19.
- Miron VE, Boyd A, Zhao J-W *et al.* (2013) M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nature neuroscience*, 1–10.
- Misu T, Fujihara K, Kakita a *et al.* (2007) Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: distinction from multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **130**, 1224–34.
- Misu T, Höftberger R, Fujihara K *et al.* (2013) Presence of six different lesion types suggests diverse mechanisms of tissue injury in neuromyelitis optica. *Acta neuropathologica*, **125**, 815–27.
- Mitrovic B, Ignarro LJ, Angeles L (1994) Nitric oxide as a potential pathological mechanism in demyelination: its differential effects on primary glial cells in vitro. *Neuroscience*, **61**, 575–585.
- Mittelbronn M, Dietz K, Schluesener HJ, Meyermann R (2001) Local distribution of microglia in the normal adult human central nervous system differs by up to one order of magnitude. *Acta neuropathologica*, **101**, 249–55.
- Moalem G, Gdalyahu A, Shani Y *et al.* (2000) Production of neurotrophins by activated T cells: implications for neuroprotective autoimmunity. *Journal of autoimmunity*, **15**, 331–45.
- Moll NM, Rietsch AM, Thomas S *et al.* (2011) Multiple sclerosis normal-appearing white matter: pathology-imaging correlations. *Annals of neurology*, **70**, 764–73.
- Möller JC, Klein MA, Haas S *et al.* (1996) Regulation of thrombospondin in the regenerating mouse facial motor nucleus. *Glia*, **17**, 121–32.
- Monje ML, Toda H, Palmer TD (2003) Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science (New York, N.Y.)*, **302**, 1760–5.
- Monji A (2012) The neuroinflammation hypothesis of psychiatric disorders. *Seishin Shinkeigaku Zasshi*, **114**, 124–133.
- Monji A, Kato T, Kanba S (2009) Cytokines and schizophrenia: Microglia hypothesis of schizophrenia. *Psychiatry and Clinical Neurosciences*, **63**, 257–265.
- Moon H, Kim S, Tang Y *et al.* (2012) Macrophage migration inhibitory factor mediates the antidepressant actions of voluntary exercise. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 13094–13099.
- Moore GRW, Laule C, Mackay A *et al.* (2008) Dirty-appearing white matter in multiple sclerosis: preliminary observations of myelin phospholipid and axonal loss. *Journal of neurology*, **255**, 1802–11, discussion 1812.
- Morandi F, Venturi C, Rizzo R *et al.* (2013) Intrathecal soluble HLA-E correlates with disease activity in patients with multiple sclerosis and may cooperate with soluble HLA-G in the resolution of neuroinflammation. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, **8**, 944–55.
- Moreau T, Fromont A, Rumbach L, Defer G, Legros H (2012) La SEP est-elle une maladie issue de l'environnement? In: *La sclérose en plaques* (ed Moreau T), pp. 61–93. ARSEP fondation.
- Morris H, Waite A, Williams N, Neal J, Blake D (2012) Recent Advances in the Genetics of the ALS-FTLD Complex. *Current Neurology and Neuroscience Reports*, **12**, 243–250.
- Mosser DM, Edwards JP (2008) Exploring the full spectrum of macrophage activation. *Nature reviews. Immunology*, **8**, 958–69.
- Mowry EM, Carey RF, Blasco MR *et al.* (2013) Multiple sclerosis susceptibility genes: associations with relapse severity and recovery. *PloS one*, **8**, e75416.
- Munger KL, Zhang SM, O'Reilly E *et al.* (2004) Vitamin D intake and incidence of multiple sclerosis. *Neurology*, **62**, 60–5.
- Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KHG (2010) Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, behavior, and immunity*, **24**, 641–51.
- Murray T (2009) Robert Carswell: The First Illustrator of MS. *The international MS Journal*, **16**, 98–101.
- Murray P, Wynn T (2012) Protective and pathogenic functions of macrophage subsets. *Nature reviews. Immunology*, **11**, 723–737.
- Nagalakshmi U, Waern K, Snyder M (2010) RNA-Seq: a method for comprehensive transcriptome analysis. In: *Current protocols in molecular biology / edited by Frederick M. Ausubel ... [et al.]*, p. Unit 4.11.1–13.
- Nair A, Frederick TJ, Miller SD (2008) Astrocytes in Multiple Sclerosis : A Product of their Environment. *Cell Mol Life Sci*, **65**, 2702–2720.
- Naismith RT, Xu J, Klawiter EC *et al.* (2013) Spinal cord tract diffusion tensor imaging reveals disability substrate in demyelinating disease. *Neurology*, **80**, 2201–9.
- Nakajima M, Kawamura T, Tokui R *et al.* (2013) Enhanced accumulation of Kir4.1 protein, but not mRNA, in a murine model of cuprizone-induced demyelination. *Brain research*, **1537**, 340–9.
- Nakajimi K, Kohsaka S (2001) Microglia: Activation and Their Significance in the Central Nervous System. *JB Review*, **130**, 169–175.
- Nakamura Y (2002) Regulating factors for microglial activation. *Biological & pharmaceutical bulletin*, **25**, 945–53.
- Napoli I, Neumann H (2010) Protective effects of microglia in multiple sclerosis. *Experimental neurology*, **225**, 24–8.
- Narayanan S, Fu L, Pioro E *et al.* (1997) Imaging of axonal damage in multiple sclerosis: spatial distribution of magnetic resonance imaging lesions. *Annals of neurology*, **41**, 385–91.
- Nave K-A (2010) Myelination and the trophic support of long axons. *Nature reviews. Neuroscience*, **11**, 275–83.

- Nave K-A, Salzer JL (2006) Axonal regulation of myelination by neuregulin 1. *Current opinion in neurobiology*, **16**, 492–500.
- Nave K-A, Trapp BD (2008) Axon-glia signaling and the glial support of axon function. *Annual review of neuroscience*, **31**, 535–61.
- Nebuloni M, Pellegrinelli A, Ferri A *et al.* (2000) Etiology of microglial nodules in brains of patients with acquired immunodeficiency syndrome. *Journal of neurovirology*, **6**, 46–50.
- Nedergaard M, Ransom B, Goldman SA (2003) New roles for astrocytes: redefining the functional architecture of the brain. *Trends in neurosciences*, **26**, 523–30.
- Netea MG, Quintin J, van der Meer JWM (2011) Trained immunity: a memory for innate host defense. *Cell host & microbe*, **9**, 355–61.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H (2002) Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends in neurosciences*, **25**, 313–9.
- Neumann H, Takahashi K (2007) Essential role of the microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2 (TREM2) for central nervous tissue immune homeostasis. *Journal of neuroimmunology*, **184**, 92–9.
- Newcombe J, Uddin A, Dove R *et al.* (2008) Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, **18**, 52–61.
- Nguyen MD, Julien J-P, Rivest S (2002) Innate immunity: the missing link in neuroprotection and neurodegeneration? *Nature reviews. Neuroscience*, **3**, 216–27.
- Nicchia GP, Srinivas M, Li W *et al.* (2005) New possible roles for aquaporin-4 in astrocytes: cell cytoskeleton and functional relationship with connexin43. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **19**, 1674–6.
- Niederhorn JY (2008) Emerging concepts in CD8(+) T regulatory cells. *Current opinion in immunology*, **20**, 327–31.
- Nijeholt GJ, Bergers E, Kamphorst W *et al.* (2001) Post-mortem high-resolution MRI of the spinal cord in multiple sclerosis: a correlative study with conventional MRI, histopathology and clinical phenotype. *Brain*, **124**, 154–66.
- Nijeholt GJ, van Walderveen MA, Castelijns JA *et al.* (1998) Brain and spinal cord abnormalities in multiple sclerosis. Correlation between MRI parameters, clinical subtypes and symptoms. *Brain : a journal of neurology*, **121 (Pt 4)**, 687–97.
- Nijland PG, Michailidou I, Witte ME *et al.* (2014) Cellular distribution of glucose and monocarboxylate transporters in human brain white matter and multiple sclerosis lesions. *Glia*, n/a–n/a.
- Nikolakopoulou AM, Dutta R, Chen Z, Miller RH, Trapp BD (2013) Activated microglia enhance neurogenesis via trypsinogen secretion. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **110**.
- Nimmerjahn A, Kirchhoff F, Helmchen F (2005) Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo. *Science (New York, N.Y.)*, **308**, 1314–8.
- Noël W, Raes G, Hassanzadeh Ghassabeh G, De Baetselier P, Beschin A (2004) Alternatively activated macrophages during parasite infections. *Trends in parasitology*, **20**, 126–33.
- Van Noort JM, van den Elsen PJ, van Horssen J *et al.* (2011) Preactive multiple sclerosis lesions offer novel clues for neuroprotective therapeutic strategies. *CNS & neurological disorders drug targets*, **10**, 68–81.
- Oberheim NA, Wang X, Goldman S, Nedergaard M (2006) Astrocytic complexity distinguishes the human brain. *Trends in neurosciences*, **29**, 547–53.
- Offen D, Barhum Y, Melamed E *et al.* (2009) Spinal cord mRNA profile in patients with ALS: comparison with transgenic mice expressing the human SOD-1 mutant. *Journal of molecular neuroscience*, **38**, 85–93.
- Oh J, Saidha S, Chen M *et al.* (2013) Spinal cord quantitative MRI discriminates between disability levels in multiple sclerosis. *Neurology*, **80**, 540–7.
- Oksenberg JR, Baranzini SE (2010) Multiple sclerosis genetics--is the glass half full, or half empty? *Nature reviews. Neurology*, **6**, 429–37.
- Okuda DT, Mowry EM, Cree BAC *et al.* (2011) Asymptomatic spinal cord lesions predict disease progression in radiologically isolated syndrome. *Neurology*, **76**, 686–92.
- Olah M, Amor S, Brouwer N *et al.* (2012) Identification of a microglia phenotype supportive of remyelination. *Glia*, **60**, 306–21.
- Oldstone MB (1998) Molecular mimicry and immune-mediated diseases. *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, **12**, 1255–65.
- Olson JK, Miller SD (2004) Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **173**, 3916–24.
- Omari KM, John G, Lango R, Raine CS (2006) Role for CXCR2 and CXCL1 on glia in multiple sclerosis. *Glia*, **53**, 24–31.
- Orr AG, Orr AL, Li X-J, Gross RE, Traynelis SF (2009) Adenosine A(2A) receptor mediates microglial process retraction. *Nature neuroscience*, **12**, 872–8.
- Orre M, Kamphuis W, Dooves S *et al.* (2013) Reactive glia show increased immunoproteasome activity in Alzheimer's disease. *Brain*, **136**, 1415–31.
- Owens GP, Bennett JL, Lassmann H *et al.* (2009) Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid. *Annals of neurology*, **65**, 639–49.

- Palmer C, Diehn M, Alizadeh AA, Brown PO (2006) Cell-type specific gene expression profiles of leukocytes in human peripheral blood. *BMC genomics*, **7**, 115.
- Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP (1987) Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet*, **1**, 893–5.
- Pannemans K, Broux B, Goris A *et al.* (2013) HLA-E restricted CD8+ T cell subsets are phenotypically altered in multiple sclerosis patients. *Multiple Sclerosis*.
- Panula P, Nuutinen S (2013) The histaminergic network in the brain: basic organization and role in disease. *Nature reviews. Neuroscience*, **14**, 472–87.
- Paolicelli RC, Bolasco G, Pagani F *et al.* (2011) Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science (New York, N.Y.)*, **333**, 1456–8.
- Papanikolaou N, Papadaki E, Karampekios S *et al.* (2004) T2 relaxation time analysis in patients with multiple sclerosis: correlation with magnetization transfer ratio. *European radiology*, **14**, 115–22.
- Parras CM, Hunt C, Sugimori M *et al.* (2007) The proneural gene Mash1 specifies an early population of telencephalic oligodendrocytes. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **27**, 4233–42.
- Pascual O, Ben Achour S, Rostaing P, Triller A, Bessis A (2012) Microglia activation triggers astrocyte-mediated modulation of excitatory neurotransmission. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, E197–205.
- Pasinetti G (1996) Inflammatory mechanisms in neurodegeneration and Alzheimer's disease: the role of the complement system. *Neurobiol Aging*, **17**, 707–716.
- Patani R, Balaratnam M, Vora A, Reynolds R (2007) Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course. *Neuropathology and applied neurobiology*, **33**, 277–87.
- Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A *et al.* (2006) Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain : a journal of neurology*, **129**, 3165–72.
- Patrucco L, Rojas JI, Cristiano E (2012) Assessing the value of spinal cord lesions in predicting development of multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *Journal of neurology*, **259**, 1317–20.
- Patsopoulos N, Barcellos L, Hintzen R (2013) Fine-Mapping the Genetic Association of the Major Histocompatibility Complex in Multiple Sclerosis: HLA and Non-HLA Effects. *PLoS genetics*, **9**, e1003926.
- Pelletier J (2012) Peut-on voir la SEP en imagerie? In: *La sclérose en plaques* (ed Moreau T), pp. 105–132. ARSEP fondation.
- Pelletier D, Nelson S, Oh J *et al.* (2003) MRI lesion volume heterogeneity in primary progressive MS in relation with axonal damage and brain atrophy. *J Neurol Neurosurg Psychiatry*, **74**, 950–952.
- Perron H, Germi R, Bernard C *et al.* (2012) Human endogenous retrovirus type W envelope expression in blood and brain cells provides new insights into multiple sclerosis disease. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, **18**, 1721–36.
- Perry VH (2010) Contribution of systemic inflammation to chronic neurodegeneration. *Acta Neuropathologica*, **120**, 277–286.
- Perry VH, Bolton SJ, Anthony DC, Betmouni S (1998) The contribution of inflammation to acute and chronic neurodegeneration. *Research in Immunology*, **149**, 721–725.
- Perry VH, Hume DA, Gordon S (1985) Immunohistochemical localization of macrophages and microglia in the adult and developing mouse brain. *Neuroscience*, **15**, 313–326.
- Perry VH, Lawson LJ, Reid DM (1994) Biology of the mononuclear phagocyte system of the central nervous system and HIV infection. *Journal of leukocyte biology*, **56**, 399–406.
- Perry VH, Nicoll JAR, Holmes C (2010) Microglia in neurodegenerative disease. *Nature reviews. Neurology*, **6**, 193–201.
- Peterson JW, Bö L, Mörk S, Chang A, Trapp BD (2001) Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Annals of neurology*, **50**, 389–400.
- Pétré S, Soullillou J-P, Laplaud D-A (2009) Regulatory CD4+CD25high T cells, activated CD4+CD25highCD127high T cells and multiple sclerosis. *Expert review of clinical immunology*, **5**, 115–7.
- Pflanz S, Timans JC, Cheung J *et al.* (2002) IL-27, a Heterodimeric Cytokine Composed of EB13 and p28 Protein, Induces Proliferation of Naive CD4+ T Cells. *Immunity*, **16**, 779–790.
- Philips T, De Muyneck L, Thu H *et al.* (2010) Microglial upregulation of progranulin as a marker of motor neuron degeneration. *J Neuropathol Exp Neurol.*, **69**, 1191–1200.
- Piaton G, Aigrot M-S, Williams A *et al.* (2011) Class 3 semaphorins influence oligodendrocyte precursor recruitment and remyelination in adult central nervous system. *Brain : a journal of neurology*, **134**, 1156–67.
- Piccio L, Buonsanti C, Mariani M *et al.* (2007) Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology*, **37**, 1290–301.
- Pierrot-Deseilligny C, Souberbielle J-C (2010) Is hypovitaminosis D one of the environmental risk factors for multiple sclerosis? *Brain : a journal of neurology*, **133**, 1869–88.
- Pierson ER, Stromnes IM, Goverman JM (2014) B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the central nervous system. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **192**, 929–39.
- Pitt D, Werner P, Raine CS (2000) Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. *Nature medicine*, **6**, 67–70.

- Politis M, Pavese N, Tai YF *et al.* (2011) Microglial activation in regions related to cognitive function predicts disease onset in Huntington's disease: A multimodal imaging study. *Human Brain Mapping*, **32**, 258–270.
- Polman CH, Reingold SC, Banwell B *et al.* (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Annals of neurology*, **69**, 292–302.
- Polman CH, Wolinsky JS, Reingold SC (2005) Multiple sclerosis diagnostic criteria: three years later. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, **11**, 5–12.
- Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Dittel BN (2005) Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *Journal of neuroscience research*, **81**, 374–89.
- Ponomarev ED, Veremeyko T, Barteneva N, Krichevsky AM, Weiner HL (2011) MicroRNA-124 promotes microglia quiescence and suppresses EAE by deactivating macrophages via the C/EBP- α -PU.1 pathway. *Nature medicine*, **17**, 64–70.
- Poonawalla A, Hou P, Nelson F, Wolinsky JS, Narayana PA (2008) Cervical Spinal Cord Lesions in Multiple Sclerosis: T1-weighted Inversion-Recovery MR Imaging with Phase-Sensitive Reconstruction. *Radiology*, **246**, 258–264.
- Popescu BFG, Lucchinetti CF (2012) Meningeal and cortical grey matter pathology in multiple sclerosis. *BMC neurology*, **12**, 11.
- Popovic N, Schubart A, Goetz BD *et al.* (2002) Inhibition of Autoimmune Encephalomyelitis by a Tetracycline. *Annals of neurology*, **51**, 215–223.
- Popovich PG, Guan Z, Wei P *et al.* (1999) Depletion of hematogenous macrophages promotes partial hindlimb recovery and neuroanatomical repair after experimental spinal cord injury. *Experimental neurology*, **158**, 351–65.
- Poretti A, Huisman TAGM (2013) Comment: Functional neuroimaging may quantify spinal cord demyelinating disease. *Neurology*, **80**, 2207.
- Postler E, Rimmer A, Beschorner R, Schluesener HJ, Meyermann R (2000) “Allograft-inflammatory-factor-1 is upregulated in microglial cells in human cerebral infarctions”. *Journal of neuroimmunology*, **108**, 244–50.
- Prat A, Antel J (2005) Pathogenesis of multiple sclerosis. *Current opinion in neurology*, **18**, 225–30.
- Prieto J, Revol-Muller C, Camelleti P, Odet C (2012a) Modeling 3D realistic organic tissues from 2D digital microscopy images. In: *Conference on processing biomedical images. ESMI 2012*.
- Prieto J, Revol-Muller C, Peyrin F, Camelleti P, Odet C (2012b) 3D Texture synthesis for modeling realistic organic tissues. In: *VISAPP 2012. International Conference on Computer Vision Theory and Applications*, pp. pp.60–65.
- Priller J, Flügel A, Wehner T *et al.* (2001) Targeting gene-modified hematopoietic cells to the central nervous system: use of green fluorescent protein uncovers microglial engraftment. *Nature medicine*, **7**, 1356–61.
- Prineas JW, Barnard RO, Kwon EE, Sharer LR, Cho ES (1993) Multiple sclerosis: remyelination of nascent lesions. *Annals of neurology*, **33**, 137–51.
- Prineas JW, Connell F (1979) Remyelination in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, **5**, 22–31.
- Prineas JW, Graham JS (1981) Multiple sclerosis: capping of surface immunoglobulin G on macrophages engaged in myelin breakdown. *Annals of neurology*, **10**, 149–58.
- Prineas JW, Kwon EE, Cho E-S *et al.* (2001) Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology*, **50**, 646–657.
- Prinz M, Priller J (2014) Microglia and brain macrophages in the molecular age: from origin to neuropsychiatric disease. *Nature Reviews Neuroscience*, **15**.
- Prinz M, Priller J, Sisodia SS, Ransohoff RM (2011) Heterogeneity of CNS myeloid cells and their roles in neurodegeneration. *Nature neuroscience*, **14**, 1227–35.
- Puig-Kröger A, Sierra-Filardi E, Domínguez-Soto A *et al.* (2009) Folate receptor beta is expressed by tumor-associated macrophages and constitutes a marker for M2 anti-inflammatory/regulatory macrophages. *Cancer research*, **69**, 9395–403.
- Qin H, Yeh W, Sarno P De *et al.* (2012) Signal transducer and activator of transcription- axis in myeloid cells regulates neuroinflammation. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **3**, 1–6.
- Qiu J, Cai D, Filbin M (2000) Glial inhibition of nerve regeneration in the mature mammalian CNS. *Glia*, **29**, 166–174.
- Quatromoni JG, Eruslanov E (2012) Tumor-associated macrophages: function, phenotype, and link to prognosis in human lung cancer. *Am J Transl Res*, **4**, 376–389.
- Raivich G, Jones LL, Kloss CU *et al.* (1998) Immune surveillance in the injured nervous system: T-lymphocytes invade the axotomized mouse facial motor nucleus and aggregate around sites of neuronal degeneration. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **18**, 5804–16.
- Ramaglia V, Hughes TR, Donev RM *et al.* (2012) C3-dependent mechanism of microglial priming relevant to multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **109**, 965–70.
- Ramagopalan S V, Knight JC, Ebers GC (2009) Multiple sclerosis and the major histocompatibility complex. *Current opinion in neurology*, **22**, 219–25.
- Ransohoff RM, Brown MA (2012a) Innate immunity in the central nervous system. *The Journal of Clinical Investigation*, **122**, 1164–1171.
- Ransohoff RM, Cardona AE (2010) The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature*, **468**, 253–62.
- Ransohoff RM, Kivisäkk P, Kidd G (2003) Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system. *Nature reviews. Immunology*, **3**, 569–81.

- Ransohoff RM, Perry VH (2009) Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annual review of immunology*, **27**, 119–45.
- Rawes JA, Calabrese VP, Khan OA, DeVries GH (1997) Antibodies to the axolemma-enriched fraction in the cerebrospinal fluid and serum of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, **3**, 363–9.
- Rawji KS, Yong VW (2013) The Benefits and Detriments of Macrophages/Microglia in Models of Multiple Sclerosis. *Clinical and Developmental Immunology*, **2013**, 1–13.
- Ren Z, Wang Y, Tao D *et al.* (2010) Central nervous system expression of interferon regulatory factor 1 regulates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, **5**, 260–5.
- Rentzos M, Evangelopoulos E, Sereti E *et al.* (2012) Alterations of T cell subsets in ALS: a systemic immune activation? *Acta neurologica Scandinavica*, **125**, 260–4.
- Reuter F, Zaaraoui W, Crespy L *et al.* (2011) Frequency of cognitive impairment dramatically increases during the first 5 years of multiple sclerosis. *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, **82**, 1157–1159.
- Revesz T, Kidd D, Thompson AJ, Barnard RO, McDonald WI (1994) A comparison of the pathology of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **117 (Pt 4)**, 759–65.
- Ricard D, Stankoff B, Bagnard D *et al.* (2000) Differential expression of collapsin response mediator proteins (CRMP/ULIP) in subsets of oligodendrocytes in the postnatal rodent brain. *Molecular and cellular neurosciences*, **16**, 324–37.
- Rice CM, Cottrell D, Wilkins A, Scolding NJ (2013) Primary progressive multiple sclerosis: progress and challenges. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **84**, 1100–6.
- Richardson WD, Kessaris N, Pringle N (2006) Oligodendrocyte wars. *Nature reviews. Neuroscience*, **7**, 11–8.
- Richardson WD, Smith HK, Sun T *et al.* (2000) Oligodendrocyte lineage and the motor neuron connection. *Glia*, **29**, 136–42.
- Richardson WD, Young KM, Tripathi RB, McKenzie I (2011) NG2-glia as multipotent neural stem cells: fact or fantasy? *Neuron*, **70**, 661–73.
- Ringnér M (2008) What is principal component analysis? *Nature biotechnology*, **26**, 303–4.
- Rocca MA, Mezzapesa DM, Falini A *et al.* (2003) Evidence for axonal pathology and adaptive cortical reorganization in patients at presentation with clinically isolated syndromes suggestive of multiple sclerosis. *NeuroImage*, **18**, 847–55.
- Rochford R, Cannon MJ, Moormann AM (2005) Endemic Burkitt's lymphoma: a polymicrobial disease? *Nature reviews. Microbiology*, **3**, 182–7.
- Rodriguez M, Scheithauer B (1994) Ultrastructure of multiple sclerosis. *Ultrastructural pathology*, **18**, 3–13.
- Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA *et al.* (2007) Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **130**, 1194–205.
- Ropele S, Strasser-Fuchs S, Augustin M *et al.* (2000) A comparison of magnetization transfer ratio, magnetization transfer rate, and the native relaxation time of water protons related to relapsing-remitting multiple sclerosis. *AJNR. American journal of neuroradiology*, **21**, 1885–91.
- Ross DT, Scherf U, Eisen MB *et al.* (2000) Systematic variation in gene expression patterns in human cancer cell lines. *Nature genetics*, **24**, 227–35.
- Rovaris M, Bozzali M, Santuccio G *et al.* (2001a) In vivo assessment of the brain and cervical cord pathology of patients with primary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **124**, 2540–9.
- Rovaris M, Comi G, Filippi M (2001b) The role of non-conventional MR techniques to study multiple sclerosis patients. *Journal of the neurological sciences*, **186 Suppl**, S3–9.
- Ruet A, Deloire MSA, Ouallet J-C, Molinier S, Brochet B (2011) Predictive factors for multiple sclerosis in patients with clinically isolated spinal cord syndrome. *Multiple sclerosis (Houndmills, Basingstoke, England)*, **17**, 312–8.
- Saijo K, Glass CK (2011) Microglial cell origin and phenotypes in health and disease. *Nature reviews. Immunology*, **11**, 775–87.
- Salou M, Ngonon AE, Garcia A, Michel L, Laplaud D (2013) Immunité adaptative et physiopathologie de la sclérose en plaques. *La revue de médecine interne*, **34**, 479–486.
- Sánchez I, Hassinger L, Paskevich PA, Shine HD, Nixon RA (1996) Oligodendroglia regulate the regional expansion of axon caliber and local accumulation of neurofilaments during development independently of myelin formation. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **16**, 5095–105.
- Sanchez-Guajardo V, Barnum CJ, Tansey MG, Romero-Ramos M (2013) Neuroimmunological processes in Parkinson's disease and their relation to α -synuclein: microglia as the referee between neuronal processes and peripheral immunity. *ASN neuro*, **5**, 113–39.
- Sanfilippo MP, Benedict RHB, Weinstock-Guttman B, Bakshi R (2006) Gray and white matter brain atrophy and neuropsychological impairment in multiple sclerosis. *Neurology*, **66**, 685–92.
- Sapp E, Kegel K, Aronin N *et al.* (2001) Early and progressive accumulation of reactive microglia in the Huntington disease brain. *J Neuropathol Exp Neurol.*, **60**, 161–172.

- Saresella M, Piancone F, Tortorella P *et al.* (2013) T helper-17 activation dominates the immunologic milieu of both amyotrophic lateral sclerosis and progressive multiple sclerosis. *Clinical immunology (Orlando, Fla.)*, **148**, 79–88.
- Scalfari A, Neuhaus A, Degenhardt A *et al.* (2010) The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study 10: relapses and long-term disability. *Brain : a journal of neurology*, **133**, 1914–29.
- Schirmer L, Albert M, Buss A *et al.* (2009) Substantial early, but nonprogressive neuronal loss in multiple sclerosis (MS) spinal cord. *Annals of neurology*, **66**, 698–704.
- Schirmer L, Antel J, Brück W, Stadelmann C (2011) Axonal loss and neurofilament phosphorylation changes accompany lesion development and clinical progression in multiple sclerosis. *Brain Pathology*, **21**, 428–440.
- Schmidt C, Hattungen E, Faehndrich J, Jurcoane A, Porto L (2012) Detectability of multiple sclerosis lesions with 3T MRI: a comparison of proton density-weighted and FLAIR sequences. *Journal of neuroradiology. Journal de neuroradiologie*, **39**, 51–6.
- Schmierer K, Parkes HG, So P-W *et al.* (2010) High field (9.4 Tesla) magnetic resonance imaging of cortical grey matter lesions in multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **133**, 858–67.
- Schnell L, Fearn S, Klassen H, Schwab ME, Perry VH (1999) Acute inflammatory responses to mechanical lesions in the CNS: differences between brain and spinal cord. *The European journal of neuroscience*, **11**, 3648–58.
- Schreitmüller B, Leyhe T, Stransky E, Köhler N, Laske C (2012) Elevated angiopoietin-1 serum levels in patients with Alzheimer's disease. *International journal of Alzheimer's disease*, **2012**, 324016.
- Schulz C, Gomez Perdiguero E, Chorro L *et al.* (2012) A lineage of myeloid cells independent of Myb and hematopoietic stem cells. *Science (New York, N.Y.)*, **336**, 86–90.
- Schwab M, Schnell L (1989) Region-specific appearance of myelin constituents in the developing rat spinal cord. *J Neurocytol*, **18**, 161–169.
- Seewann A, Vrenken H, Valk P Van Der *et al.* (2009) Diffusely Abnormal White Matter in Chronic Multiple Sclerosis. *Arch Neurol*, **66**, 601–609.
- Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A *et al.* (2008) Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet neurology*, **7**, 796–804.
- Selmaj KW, Raine CS (1988) Tumor necrosis factor mediates myelin and oligodendrocyte damage in vitro. *Annals of neurology*, **23**, 339–46.
- Serafini B, Rosicarelli B, Franciotta D *et al.* (2007) Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain. *The Journal of experimental medicine*, **204**, 2899–912.
- Shaffer AL, Rosenwald A, Hurt EM *et al.* (2001) Signatures of the Immune Response. *Immunity*, **15**, 375–385.
- Sharma R, Fischer M-T, Bauer J *et al.* (2010) Inflammation induced by innate immunity in the central nervous system leads to primary astrocyte dysfunction followed by demyelination. *Acta neuropathologica*, **120**, 223–36.
- Shefner JM, Mackin GA, Dawson DM (1992) Lower motor neuron dysfunction in patients with multiple sclerosis. *Muscle & nerve*, **15**, 1265–70.
- Shen-orr SS, Tibshirani R, Khatri P *et al.* (2010) Cell type – specific gene expression differences in complex tissues. *Nature methods*, **7**, 287–291.
- Shin J-Y, Fang Z-H, Yu Z-X *et al.* (2005) Expression of mutant huntingtin in glial cells contributes to neuronal excitotoxicity. *The Journal of cell biology*, **171**, 1001–12.
- Shoemaker JE, Lopes TJS, Ghosh S *et al.* (2012) CTen: a web-based platform for identifying enriched cell types from heterogeneous microarray data. *BMC genomics*, **13**, 460.
- Sica A, Mantovani A (2012) Macrophage plasticity and polarization: in vivo veritas. *The Journal of Clinical Investigation*, **122**, 787–795.
- Siffrin V, Vogt J, Radbruch H *et al.* (2010) Multiple sclerosis - candidate mechanisms underlying CNS atrophy. *Trends in neurosciences*, **33**, 202–210.
- Silver J, Miller JH (2004) Regeneration beyond the glial scar. *Nature reviews. Neuroscience*, **5**, 146–56.
- Silwedel C, Förster C (2006) Differential susceptibility of cerebral and cerebellar murine brain microvascular endothelial cells to loss of barrier properties in response to inflammatory stimuli. *Journal of neuroimmunology*, **179**, 37–45.
- Simhadri VR, Andersen JF, Calvo E *et al.* (2012) Human CD300a binds to phosphatidylethanolamine and phosphatidylserine, and modulates the phagocytosis of dead cells. *Blood*, **119**, 2799–809.
- Sinclair C, Kirk J, Herron B, Fitzgerald U, McQuaid S (2007) Absence of aquaporin-4 expression in lesions of neuromyelitis optica but increased expression in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter. *Acta neuropathologica*, **113**, 187–194.
- Singh S, Metz I, Amor S *et al.* (2013) Microglial nodules in early multiple sclerosis white matter are associated with degenerating axons. *Acta neuropathologica*, **125**, 595–608.
- Skripuletz T, Hackstette D, Bauer K *et al.* (2013) Astrocytes regulate myelin clearance through recruitment of microglia during cuprizone-induced demyelination. *Brain : a journal of neurology*, **136**, 147–67.
- Sloka S, Metz LM, Hader W, Starreveld Y, Yong VW (2013) Reduction of microglial activity in a model of multiple sclerosis by dipyrindamole. *Journal of neuroinflammation*, **10**, 89.
- Smith KJ, Blakemore WF, McDonald WI (1981) The restoration of conduction by central remyelination. *Brain : a journal of neurology*, **104**, 383–404.

- Smith RS, Maes M (1995) The macrophage-T-lymphocyte theory of schizophrenia: additional evidence. *Medical hypotheses*, **45**, 135–41.
- Sofroniew M V (2005) Reactive Astrocytes in Neural Repair and Protection. *The Neuroscientist*, **11**, 400–407.
- Sofroniew M V, Vinters H V (2010) Astrocytes: biology and pathology. *Acta neuropathologica*, **119**, 7–35.
- Solanky BS, Abdel-Aziz K, Yiannakas MC *et al.* (2013) In vivo magnetic resonance spectroscopy detection of combined glutamate-glutamine in healthy upper cervical cord at 3 T. *NMR in biomedicine*, **26**, 357–66.
- Somjen G (1988) Nervenkitz: notes on the history of the concept of neuroglia. *Glia*, **1**, 2–9.
- Song X, Fan X, Song X *et al.* (2013) Elevated levels of adiponectin and other cytokines in drug naïve, first episode schizophrenia patients with normal weight. *Schizophrenia research*, **150**, 269–73.
- Sorce S, Krause K (2009) NOX Enzymes in the Central Nervous System : From Signaling to Disease. *Antioxidants & redox signaling*, **11**, 2481–2504.
- Sospedra M, Martin R (2005) Immunology of multiple sclerosis. *Annual review of immunology*, **23**, 683–747.
- Srivastava R, Aslam M, Kalluri SR *et al.* (2012) Potassium channel KIR4.1 as an immune target in multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, **367**, 115–23.
- Stadelmann C, Brück W (2008) Interplay between mechanisms of damage and repair in multiple sclerosis. *Journal of neurology*, **255 Suppl**, 12–8.
- Stadelmann C, Kerschensteiner M, Misgeld T *et al.* (2002) BDNF and gp145trkB in multiple sclerosis brain lesions: neuroprotective interactions between immune and neuronal cells? *Brain*, **125**, 75–85.
- Stadelmann C, Ludwin S, Tabira T *et al.* (2005) Tissue preconditioning may explain concentric lesions in Baló's type of multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **128**, 979–87.
- Stadelmann C, Wegner C, Brück W (2011) Inflammation, demyelination, and degeneration - recent insights from MS pathology. *Biochimica et biophysica acta*, **1812**, 275–82.
- Stankiewicz JM, Neema M, Alsop DC *et al.* (2009) Spinal cord lesions and clinical status in multiple sclerosis: A 1.5 T and 3 T MRI study. *Journal of the neurological sciences*, **279**, 99–105.
- De Stefano N, Narayanan S, Francis GS *et al.* (2001) Evidence of axonal damage in the early stages of multiple sclerosis and its relevance to disability. *Archives of neurology*, **58**, 65–70.
- Steinhäuser C, Seifert G, Bedner P (2012) Astrocyte dysfunction in temporal lobe epilepsy: K⁺ channels and gap junction coupling. *Glia*, **60**, 1192–202.
- Steinman L, Zamvil SS (2005) Virtues and pitfalls of EAE for the development of therapies for multiple sclerosis. *Trends in immunology*, **26**, 565–71.
- Stephan AH, Barres BA, Stevens B (2012) The Complement System : An Unexpected Role in Synaptic Pruning During Development and Disease. *Annual review of neuroscience*, **35**, 369–389.
- Sternberg E (1997) Perspectives Series : Cytokines and the Brain. *The Journal of Clinical Investigation*, **100**, 2641–2647.
- Stevenson VL, Leary SM, Losseff NA *et al.* (1998) Spinal cord atrophy and disability in MS: a longitudinal study. *Neurology*, **51**, 234–8.
- Stoll M, Capper D, Dietz K *et al.* (2006) Differential microglial regulation in the human spinal cord under normal and pathological conditions. *Neuropathology and applied neurobiology*, **32**, 650–61.
- Stoll G, Jander S (1999) The role of microglia and macrophages in the pathophysiology of the CNS. *Progress in neurobiology*, **58**, 233–47.
- Stoltzner SE, Grenfell TJ, Mori C *et al.* (2000) Temporal accrual of complement proteins in amyloid plaques in Down's syndrome with Alzheimer's disease. *The American journal of pathology*, **156**, 489–99.
- Streit WJ, Mrak RE, Griffin WST (2004) Microglia and neuroinflammation: a pathological perspective. *Journal of neuroinflammation*, **1**, 14.
- Stys PK (2005) General mechanisms of axonal damage and its prevention. *Journal of the Neurological Sciences*, **233**, 3–13.
- Stys PK, Zamponi GW, van Minnen J, Geurts JJG (2012) Will the real multiple sclerosis please stand up? *Nature reviews. Neuroscience*, **13**, 507–14.
- Szuchet S, Domowicz MS, Hudson LD (2001) Oligodendrocytes. In: *eLS*. John Wiley & Sons, Ltd.
- Tabernero A, Medina JM, Giaume C (2006) Glucose metabolism and proliferation in glia: role of astrocytic gap junctions. *Journal of neurochemistry*, **99**, 1049–61.
- Tachikawa M, Fukaya M, Terasaki T, Ohtsuki S, Watanabe M (2004) Distinct cellular expressions of creatine synthetic enzyme GAMT and creatine kinases uCK-Mi and CK-B suggest a novel neuron-glia relationship for brain energy homeostasis. *The European journal of neuroscience*, **20**, 144–60.
- Tada BY, Ho A, Matsuyama T, Mak TW (1997) Reduced Incidence and Severity of Antigen-induced Regulatory Factor-1. *J Exp Med*, **185**, 231–238.
- Takahashi K, Prinz M, Stagi M, Chechneva O, Neumann H (2007) TREM2-transduced myeloid precursors mediate nervous tissue debris clearance and facilitate recovery in an animal model of multiple sclerosis. *PLoS medicine*, **4**, e124.
- Takahashi K, Rochford CDP, Neumann H (2005) Clearance of apoptotic neurons without inflammation by microglial triggering receptor expressed on myeloid cells-2. *The Journal of experimental medicine*, **201**, 647–57.

- Takano T, Tian G-F, Peng W *et al.* (2006) Astrocyte-mediated control of cerebral blood flow. *Nature neuroscience*, **9**, 260–7.
- Tallantyre EC, Bø L, Al-Rawashdeh O *et al.* (2009) Greater loss of axons in primary progressive multiple sclerosis plaques compared to secondary progressive disease. *Brain : a journal of neurology*, **132**, 1190–9.
- Tallantyre E, Bø L, Al-Rawashdeh O *et al.* (2010) Clinico-pathological evidence that axonal loss underlies disability in progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis*, **16**, 406–411.
- Tan J (1999) Microglial Activation Resulting from CD40-CD40L Interaction After β -Amyloid Stimulation. *Science*, **286**, 2352–2355.
- Tan PK (2003) Evaluation of gene expression measurements from commercial microarray platforms. *Nucleic Acids Research*, **31**, 5676–5684.
- Tanabe S, Heesen M, Yoshizawa I *et al.* (1997) Functional Expression. *Journal of immunology*, **159**, 905–911.
- Tanaka T, Murakami K, Bando Y, Yoshida S (2013) Minocycline reduces remyelination by suppressing ciliary neurotrophic factor expression after cuprizone-induced demyelination. *Journal of neurochemistry*, **127**, 259–70.
- Tavazoie S, Church GM (1998) Quantitative whole-genome analysis of DNA-protein interactions by in vivo methylase protection in *E. coli*. *Nature biotechnology*, **16**, 566–571.
- Tench CR, Morgan PS, Jaspan T, Auer DP, Constantinescu CS (2005) Spinal cord imaging in multiple sclerosis. *Journal of neuroimaging : official journal of the American Society of Neuroimaging*, **15**, 94S–102S.
- Thangarajh M, Masterman T, Rot U *et al.* (2005) Increased levels of APRIL (a proliferation-inducing ligand) mRNA in multiple sclerosis. *Journal of neuroimmunology*, **167**, 210–4.
- Théry C, Chamak B, Mallat M (1991) Cytotoxic Effect of Brain Macrophages on Developing. *The European journal of neuroscience*, **3**, 1155–1164.
- Thompson AJ, Kermode AG, Wicks D *et al.* (1991) Major differences in the dynamics of primary and secondary progressive multiple sclerosis. *Annals of neurology*, **29**, 53–62.
- Thompson AJ, Polman CH, Miller DH *et al.* (1997) Primary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **120**, 1085–96.
- Tilleux S, Goursaud S, Hermans E (2009) Selective up-regulation of GLT-1 in cultured astrocytes exposed to soluble mediators released by activated microglia. *Neurochemistry international*, **55**, 35–40.
- Tompkins SM, Padilla J, Dal Canto MC *et al.* (2002) De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **168**, 4173–83.
- Tran T, Paz P, Velichko S *et al.* (2010) Interferon β -1b Induces the Expression of RGS1 a Negative Regulator of G-Protein Signaling. *International journal of cell biology*, **2010**, 529376.
- Trapp BD, Kidd GJ (2000) Axo-Glial Septate Junctions : The Maestro of Nodal Formation and Myelination? *the Journal of Cell Biology*, **150**, F97–F100.
- Trapp BD, Nave K-A (2008) Multiple sclerosis: an immune or neurodegenerative disorder? *Annual review of neuroscience*, **31**, 247–69.
- Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM *et al.* (1998) Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *The New England journal of medicine*, **338**, 278–85.
- Trapp BD, Ransohoff R, Rudick R (1999) Axonal pathology in multiple sclerosis: relationship to neurologic disability. *Current opinion in neurology*, **12**, 295–302.
- Traugott U, Reinherz EL, Raine CS (1983) Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions. *Science (New York, N.Y.)*, **219**, 308–10.
- Tremblay M-È, Lowery RL, Majewska AK (2010) Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS biology*, **8**, e1000527.
- Troost D, Van den Oord JJ, Vianney de Jong JM (1990) Immunohistochemical characterization of the inflammatory infiltrate in amyotrophic lateral sclerosis. *Neuropathology and applied neurobiology*, **16**, 401–10.
- Tusher VG, Tibshirani R, Chu G (2001) Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **98**, 5116–21.
- Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ *et al.* (2008) Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *The American journal of pathology*, **172**, 146–55.
- Ueno M, Fujita Y, Tanaka T *et al.* (2013) Layer V cortical neurons require microglial support for survival during postnatal development. *Nature neuroscience*, **16**, 543–51.
- Underhill DM, Goodridge HS (2012) Information processing during phagocytosis. *Nature reviews. Immunology*, **12**, 492–502.
- Vallejo-Illarramendi A, Domercq M, Pérez-Cerdá F, Ravid R, Matute C (2006) Increased expression and function of glutamate transporters in multiple sclerosis. *Neurobiology of disease*, **21**, 154–64.
- Vallstedt A, Klos JM, Ericson J (2005) Multiple dorsoventral origins of oligodendrocyte generation in the spinal cord and hindbrain. *Neuron*, **45**, 55–67.
- VanAmerongen BM, Dijkstra CD, Lips P, Polman CH (2004) Multiple sclerosis and vitamin D: an update. *European journal of clinical nutrition*, **58**, 1095–109.

- Vargas ME, Barres BA (2007) Why is Wallerian degeneration in the CNS so slow? *Annual review of neuroscience*, **30**, 153–79.
- Variend S, O'Neill D, Arnold P (1997) The possible significance of cytomegaloviral parotitis in infant and early childhood deaths. *Archives of pathology & laboratory medicine*, **121**, 1272–6.
- Varnum MM, Ikezu T (2012) The classification of microglial activation phenotypes on neurodegeneration and regeneration in Alzheimer's disease brain. *Archivum immunologiae et therapeuticae experimentalis*, **60**, 251–66.
- Vellinga MM, Oude Engberink RD, Seewann A *et al.* (2008) Pluriformity of inflammation in multiple sclerosis shown by ultra-small iron oxide particle enhancement. *Brain : a journal of neurology*, **131**, 800–7.
- Venet D, Dumont JE, Detours V (2011) Most random gene expression signatures are significantly associated with breast cancer outcome. *PLoS computational biology*, **7**, e1002240.
- Venken K, Hellings N, Liblau R, Stinissen P (2010) Disturbed regulatory T cell homeostasis in multiple sclerosis. *Trends in molecular medicine*, **16**, 58–68.
- Vercellino M, Plano F, Votta B *et al.* (2005) Grey matter pathology in multiple sclerosis. *Journal of neuropathology and experimental neurology*, **64**, 1101–7.
- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA (2004) Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *The Journal of experimental medicine*, **199**, 971–9.
- Villarino A V, Gallo E, Abbas AK (2010) STAT1-activating cytokines limit Th17 responses through both T-bet-dependent and -independent mechanisms. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, **185**, 6461–71.
- Vincent FB, Saulep-Easton D, Figgitt WA, Fairfax KA, Mackay F (2013) The BAFF/APRIL system: emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine & growth factor reviews*, **24**, 203–15.
- Virgone-Carlotta A, Uhlrich J, Akram MN *et al.* (2013) Mapping and kinetics of microglia/neuron cell-to-cell contacts in the 6-OHDA murine model of Parkinson's disease. *Glia*, **61**, 1645–58.
- Vogel DYS, Vereyken EJJ, Glim JE *et al.* (2013) Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *Journal of neuroinflammation*, **10**, 35.
- Vogt MHJ, ten Kate J, Drent RJM, Polman CH, Hupperts R (2010) Increased osteopontin plasma levels in multiple sclerosis patients correlate with bone-specific markers. *Multiple Sclerosis*, **16**, 443–449.
- Vogt J, Paul F, Aktas O *et al.* (2009) Lower motor neuron loss in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of neurology*, **66**, 310–22.
- Voskuhl RR, Peterson RS, Song B *et al.* (2009) Reactive astrocytes form scar-like perivascular barriers to leukocytes during adaptive immune inflammation of the CNS. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 11511–22.
- Voss EV, Škuljec J, Gudi V *et al.* (2012) Characterisation of microglia during de- and remyelination: can they create a repair promoting environment? *Neurobiology of disease*, **45**, 519–28.
- Vrenken H, Seewann A, Knol DL *et al.* (2010) Diffusely abnormal white matter in progressive multiple sclerosis: in vivo quantitative MR imaging characterization and comparison between disease types. *AJNR. American journal of neuroradiology*, **31**, 541–8.
- Vukusic S, Van Bockstael V, Gosselin S, Confavreux C (2007) Regional variations in the prevalence of multiple sclerosis in French farmers. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **78**, 707–9.
- Vukusic S, Confavreux C (2007) Natural history of multiple sclerosis: risk factors and prognostic indicators. *Current opinion in neurology*, **20**, 269–274.
- Wake H, Moorhouse AJ, Jinno S, Kohsaka S, Nabekura J (2009) Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **29**, 3974–80.
- Wallraff A, Köhling R, Heinemann U *et al.* (2006) The impact of astrocytic gap junctional coupling on potassium buffering in the hippocampus. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **26**, 5438–47.
- Wang X, Pinto-Duarte A, Sejnowski T, Behrens M (2013) How Nox2-containing NADPH oxidase affects cortical circuits in the NMDA receptor antagonist model of schizophrenia. *Antioxidants & redox signaling*, **18**, 1444–1462.
- Wanner IB, Anderson MA, Song B *et al.* (2013) Glial scar borders are formed by newly proliferated, elongated astrocytes that interact to corral inflammatory and fibrotic cells via STAT3-dependent mechanisms after spinal cord injury. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, **33**, 12870–86.
- Waxman SG (2006) Axonal conduction and injury in multiple sclerosis: the role of sodium channels. *Nature reviews. Neuroscience*, **7**, 932–41.
- Waxman SG, Sims TJ (1984) Specificity in central myelination: evidence for local regulation of myelin thickness. *Brain research*, **292**, 179–85.
- Wegiel J, Wiśniewski HM, Dzięwiatkowski J *et al.* (1998) Reduced number and altered morphology of microglial cells in colony stimulating factor-1-deficient osteopetrotic op/op mice. *Brain research*, **804**, 135–9.
- Wegner C, Esiri MM, Chance SA, Palace J, Matthews PM (2006) Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology*, **67**, 960–7.
- Weissert R (2013) The immune pathogenesis of multiple sclerosis. *Journal of neuroimmune pharmacology : the official journal of the Society on NeuroImmune Pharmacology*, **8**, 857–66.

- Weitz TM, Town T (2012) Microglia in Alzheimer's Disease: It's All About Context. *International journal of Alzheimer's disease*, **2012**, 314185.
- Werner A, Kloss CU, Walter J, Kreutzberg GW, Raivich G (1998) Intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) in the mouse facial motor nucleus after axonal injury and during regeneration. *Journal of neurocytology*, **27**, 219–32.
- Werner P, Pitt D, Raine CS (2001) Multiple sclerosis: altered glutamate homeostasis in lesions correlates with oligodendrocyte and axonal damage. *Annals of neurology*, **50**, 169–80.
- Willer CJ, Dyment DA, Risch NJ, Sadovnick AD, Ebers GC (2003) Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **100**, 12877–82.
- Williams A, Piaton G, Lubetzki C (2007) Astrocytes--friends or foes in multiple sclerosis? *Glia*, **55**, 1300–12.
- Wolswijk G (2002) Oligodendrocyte precursor cells in the demyelinated multiple sclerosis spinal cord. *Brain : a journal of neurology*, **125**, 338–49.
- Wu E, Raine CS (1992) Multiple sclerosis. Interactions between oligodendrocytes and hypertrophic astrocytes and their occurrence in other, nondemyelinating conditions. *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology*, **67**, 88–99.
- Xie C, Li Z, Zhang G-X, Guan Y (2013) Wnt Signaling in Remyelination in Multiple Sclerosis: Friend or Foe? *Molecular neurobiology*.
- Xu M, He L (2010) Convergent evidence shows a positive association of interleukin-1 gene complex locus with susceptibility to schizophrenia in the Caucasian population. *Schizophrenia research*, **120**, 131–42.
- Yakunin E, Moser A, Loeb V *et al.* (2010) Alpha-Synuclein Abnormalities in Mouse Models of Peroxisome Biogenesis Disorders. *J neurosci res*, **88**, 1–19.
- Yang JF, Tao HQ, Liu YM *et al.* (2012a) Characterization of the interaction between astrocytes and encephalitogenic lymphocytes during the development of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice. *Clinical and experimental immunology*, **170**, 254–65.
- Yang J, Yan Y, Ma C *et al.* (2012b) Accelerated and enhanced effect of CCR5-transduced bone marrow neural stem cells on autoimmune encephalomyelitis Jingxian. *act*, **124**, 491–503.
- Yiu G, He Z (2006) Glial inhibition of CNS axon regeneration. *Nature reviews. Neuroscience*, **7**, 617–627.
- Young KM, Psachoulia K, Tripathi RB *et al.* (2013) Oligodendrocyte Dynamics in the Healthy Adult CNS : Evidence for Myelin Remodeling. *Neuron*, **77**, 873–885.
- Zambonin JL, Zhao C, Ohno N *et al.* (2011) Increased mitochondrial content in remyelinated axons: implications for multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*, **134**, 1901–13.
- Zeis T, Graumann U, Reynolds R, Schaeren-Wiemers N (2008a) Normal-appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection. *Brain : a journal of neurology*, **131**, 288–303.
- Zeis T, Kinter J, Herrero-Herranz E, Weissert R, Schaeren-Wiemers N (2008b) Gene expression analysis of normal appearing brain tissue in an animal model for multiple sclerosis revealed grey matter alterations, but only minor white matter changes. *Journal of neuroimmunology*, **205**, 10–9.
- Zeis T, Probst A, Steck AJ *et al.* (2009) Molecular changes in white matter adjacent to an active demyelinating lesion in early multiple sclerosis. *Brain pathology (Zurich, Switzerland)*, **19**, 459–66.
- Zeman AZ, Kidd D, McLean BN *et al.* (1996) A study of oligoclonal band negative multiple sclerosis. *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, **60**, 27–30.
- Zhang Y, Moore GRW, Laule C *et al.* (2013a) Pathological correlates of magnetic resonance imaging texture heterogeneity in multiple sclerosis. *Annals of neurology*, **74**, 91–99.
- Zhang F, Yao S-Y, Whetsell WO, Sriram S (2013b) Astroglipathy and oligodendroglipathy are early events in CNS demyelination. *Glia*, **61**, 1261–73.
- Zhao W, Beers DR, Liao B, Henkel JS, Appel SH (2014) Regulatory T Lymphocytes from ALS Mice Suppress Microglia and Effector T Lymphocytes Through Different Cytokine- Mediated Mechanisms. *Neurobiol dis*, **48**, 418–428.
- Zhao C, Fancy SPJ, Ffrench-Constant C, Franklin RJM (2008) Osteopontin is extensively expressed by macrophages following CNS demyelination but has a redundant role in remyelination. *Neurobiology of disease*, **31**, 209–17.
- Zhao Y, Rivieccio M, Lutz S, Scemes E, Brosnan C (2006) The TLR3 Ligand polyI:C Downregulates Connexin 43 Expression and Function in Astrocytes by a Mechanism Involving the NF- κ B and PI3 Kinase Pathways. *Glia*, **54**, 775–785.
- Zhao Y, Simon R (2010) Gene expression deconvolution in clinical samples. *Genome medicine*, **2**, 93.
- Zielasek J, Hartung HP (1996) Molecular mechanisms of microglial activation. *Advances in neuroimmunology*, **6**, 191–22.
- Zipp F, Aktas O (2006) The brain as a target of inflammation: common pathways link inflammatory and neurodegenerative diseases. *Trends in neurosciences*, **29**, 518–27.
- Zong H, Espinosa JS, Su HH, Muzumdar MD, Luo L (2005) Mosaic analysis with double markers in mice. *Cell*, **121**, 479–92.

Zujovic V, Thibaud J, Bachelin C, Vidal M, Deboux C (2011) Boundary cap cells are peripheral nervous system stem cells that can be redirected into central nervous system lineages. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **108**, 10714–10719.

ANNEXE

Tissue Remodeling in Periplaque Regions of Multiple Sclerosis Spinal Cord Lesions

Alice Lieury,^{1,2} Marie Chanal,^{1,2} Géraldine Androdias,^{1,2,3} Richard Reynolds,⁴
Sylvie Cavagna,¹ Pascale Giraudon,¹ Christian Confavreux,^{1,2,3} and Serge Nataf^{1,2,5}

Our knowledge of multiple sclerosis (MS) neuropathology has benefited from a number of studies that provided an in-depth description of plaques and, more recently, diffuse alterations of the normal-appearing white or grey matter. However, there have been few studies focusing on the periplaque regions surrounding demyelinated plaques, notably in MS spinal cords. In this context, the present study aimed to analyze the molecular immunopathology of periplaque demyelinated lesions (PDLs) in the spinal cord of patients with a progressive form of MS. To achieve this goal, the neuropathological features of PDLs were analyzed in postmortem tissues derived from the cervical spinal cord of 21 patients with primary or secondary progressive MS. We found that PDLs covered unexpectedly large areas of incomplete demyelination and were characterized by the superimposition of pro- and anti-inflammatory molecular signatures. Accordingly, macrophages/microglia accumulated in PDLs but exhibited a poor phagocytic activity toward myelin debris. Interestingly, while genes of the oligodendrocyte lineage were consistently down-regulated in PDLs, astrocyte-related molecules such as aquaporin 4, connexin 43 and the glutamate transporter EAAT1, were significantly upregulated in PDLs at the mRNA and protein levels. Overall, our work indicates that in the spinal cord of patients with a progressive form of MS, a tissue remodeling process that is temporally remote from plaque development takes place in PDLs. We propose that in spinal cord PDLs, this process is supported by subtle alterations of astrocyte functions and by low-grade inflammatory events that drive a slowly progressive loss of myelin and a failure of remyelination.

GLIA 2014;00:000–000

Key words: multiple sclerosis, periplaque, demyelination, axonal loss, microglia, astrocyte

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) and the leading cause of neurological disability affecting young adults in the Western world (Confavreux and Compston, 2006). Focal inflammatory demyelinating lesions have been extensively characterized and are traditionally classified as active, chronic active or inactive plaques according to the presence and distribution of plaque-infiltrating macrophages/microglia (Charcot, 1865; Ferguson et al., 1997; Lassmann et al., 2007; Trapp et al., 1998). Moreover, it is now well established that substantial diffuse alterations occur in the normal-appearing white matter (NAWM) of MS patients (Androdias et al., 2010; Howell et al., 2010; Kutzelnigg et al., 2005; Lovas

et al., 2000; Zeis et al., 2008). These are characterized by a diffuse axonal loss, currently considered a major cause of irreversible neurological disability (Bjartmar et al., 2000; Confavreux et al., 2000, 2003; Kutzelnigg et al., 2005; Miller et al., 2003) and a diffuse inflammatory process that develops in both the brain and spinal cord (Androdias et al., 2010; Frischer et al., 2009; Howell et al., 2010; Kutzelnigg et al., 2005). However, little attention has been given so far to the so-called periplaque, which is defined as a ribbon of tissue of variable width localized between plaque borders and the adjacent NAWM. Several studies demonstrated remyelination, in the close vicinity of plaque borders (Brück et al., 2003; Henderson et al., 2009; Patrikios et al., 2006; Prineas and Connell, 1979), but areas of incomplete demyelination, which

View this article online at wileyonlinelibrary.com. DOI: 10.1002/glia.22705

Published online Month 00, 2014 in Wiley Online Library (wileyonlinelibrary.com). Received Feb 12, 2014, Accepted for publication May 23, 2014.

Address correspondence to Serge Nataf, INSERM U1028, CNRS UMR 5292, Centre de Recherche en Neurosciences de Lyon, Equipe "Neuro-oncologie et Neuro-inflammation," Faculté Laennec, 7 rue G. Paradin, 69372 Lyon cedex 08, France. E-mail: serge.nataf@inserm.fr

From the ¹INSERM U1028, CNRS UMR 5292, Lyon Neuroscience Research Center, Neuro-Oncology and Neuro-Inflammation team, Lyon, France; ²University Lyon 1, Lyon, France; ³Service de Neurologie A and Eugène Devic Foundation, Hôpital Neurologique Pierre Wertheimer, Hospices Civils de Lyon (Lyon University Hospital), Bron, France; ⁴Wolfson Neuroscience Laboratories, Hammersmith Hospital Campus, Imperial College Faculty of Medicine, London, United Kingdom; ⁵Banque de Cellules et de Tissus, Hôpital Edouard Herriot, Hospices Civils de Lyon (Lyon University Hospital), Lyon, France.

Additional Supporting Information may be found in the online version of this article.

form the major component of periplaques, have been poorly studied (Nijeholt et al., 2001). Similarly, MRI studies using newly-developed sequences demonstrated periplaque white matter alterations (Filippi and Rocca, 2010; Ge et al., 2003; Moore et al., 2008; Ropele et al., 2000; Seewann et al., 2009; Vrenken et al., 2010) that indeed correspond to areas of incomplete demyelination (Zhang et al., 2013b). In this context, our study aimed to analyze the molecular immunopathology of periplaque demyelinated lesions (PDLs) and to identify immune mechanisms involved in PDL formation. Knowing the crucial impact of MS spinal cord lesions on the development of chronic and irreversible neurological disability (Bramow et al., 2010; Patrucco et al., 2012), we sought to characterize PDLs in the spinal cord of MS patients with progressive forms of the disease. To achieve this goal, the neuropathological and transcriptomic profiles of PDLs were assessed in postmortem cervical spinal cord samples obtained from 21 patients with secondary progressive MS (SPMS) or primary progressive MS (PPMS). Our results show that spinal cord PDLs are characterized by a slowly progressive loss of myelin accompanied by a specific molecular cross-talk that establishes between macrophages/microglia and activated astrocytes. We propose that in PDLs a chronic process of tissue remodeling occurs that is in part responsible for the perpetuation and extension of periplaque demyelination.

Material and Methods

Cases and Postmortem Material

Histological analyses were performed on postmortem spinal cord samples from 16 MS cases that were all obtained from the UK Multiple Sclerosis Tissue Bank at Imperial College (London, UK) via a UK prospective donor scheme in accordance with the relevant ethics committee approval (MREC/02/2/39). Clinical data regarding these MS patients have been previously published (Androdias et al., 2010) and are summarized in Supporting Information Table 1. The microarray study was performed on postmortem spinal cord samples from 8 MS cases obtained from the same source. Clinical data for these cases are summarized in Supporting Information Table 2.

Immunohistology

Procedures followed for immunohistology were identical to those we previously reported for the analysis of MS spinal cords (Androdias et al., 2010). See Supporting Information.

Assessment of Plaque Activity

The inflammatory activity of demyelinating lesions was evaluated on the basis of Iba-1⁺ macrophage/activated microglia density in the core and at the border of plaques as previously described (Ferguson et al., 1997; Trapp et al., 1998).

Measures of PDL Area

Following myelin basic protein (MBP) immunofluorescence labeling, MS spinal cord sections were examined at x100–200 magnification

using a fluorescent microscope (Axio Imager.Z1, Zeiss, Jena, Germany) coupled with a CCD camera (Axio Cam MRm, Zeiss). Areas of fully demyelinated tissue (plaques), partially demyelinated tissue (PDL) or apparently non-demyelinated tissue (normal-appearing white or grey matter, hereafter referred to as NAWM/NAGM) were then delineated and their surfaces measured using image analysis software (AxioVision Version 4.8 software, Zeiss). In addition, we performed a fully automated surface analysis using a macro command developed with Image J software (Fiji Image J software, Max Planck Institut, Germany). A precise protocol is provided in Supporting Information.

Quantitative Analysis of Macrophages/Microglia, Myelin, and Axonal Densities

Following MBP/neurofilament (NF) or MBP/Iba-1 double immunostainings, images from selected areas were digitally photographed at 200× magnification using a fluorescent microscope (Axioplan II, Zeiss, Munich, Germany) coupled with a CDD camera (F-View II; Soft Imaging System) and analyzed by an image analysis software (analysis 3.0; Soft Imaging System). A region of interest (ROI) was first defined and measured (mean surface area = 80,000 μm^2) in each area analyzed. Iba-1⁺, MBP⁺, and NF⁺ areas were then automatically detected after setting a threshold of positive staining in the NAWM. Then, the total area covered by MBP immunostaining, Iba-1 immunostaining, or the number of NF⁺ particles was indexed to the total area covered by the ROI. For each area analyzed (PDL, plaque or NAWM), each data represents a mean percentage of values obtained in 3 independent ROI. Finally, in four randomly chosen MS samples, absolute numbers of Iba-1⁺ macrophages/microglia were counted, allowing to confirm that numerical densities of macrophages/microglia correlated highly significantly with the percentage area of the ROI covered by Iba-1 staining ($[r\hat{\theta}] = 0.84$, P value = 1.5×10^{-13} ; Spearman rank correlation test, data not shown).

Laser Capture Microdissection

Detailed procedures are described in Supporting Information. Briefly, PDL and NAWM were isolated using the PixCell II LCM System (Arcturus, Plaisir, France). For each sample, an adjacent section was MOG immunostained to localize lesions, PDL and NAWM (Supp. Info. Fig. 1). Only PDLs covering white matter regions were microdissected.

RNA Extraction, Amplification, and Labeling

The RNeasy Micro kit (Qiagen, France), ExpressArt mRNA amplification Pico kit (AmpTec GmbH, Hamburg, Germany) and BioArray HighYield RNA transcript Labeling kit (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, NY) were used following the manufacturer's instructions. Detailed procedures are described in Supporting Information.

Microarray Hybridization and Processing

Experimental procedures were performed by the Lyon University genomic facility ProfileXpert-LCMT (Lyon) following an Affymetrix

protocol routinely used by the laboratory. See Supporting Information.

Microarray Data Analysis

For data analysis, differentially expressed genes were identified on the basis of two complementary approaches: (i) the two-class paired Significance Analysis of Microarrays (SAM) method (Tusher et al., 2001) (Supp. Info. Fig. 1C and Supp. Info. Tables 3 and 4), implemented in TIGR MEV 4.5.1 software and (ii) the non parametric paired Wilcoxon test (Tables (1–3) and Supp. Info. Table 5). Genes identified as differentially expressed were then classified using GO ontology, the gene clustering software TargetMine and a survey of the literature.

Western Blot Analysis

Plaques, PDLs, and NAWM samples obtained from macrodissection of 800 μm tissue section were lysed (20 mM Tris-HCl [pH 7.4], 10% sucrose, 1 mM EDTA, and 5 mM EGTA and Complete®), subjected to ultrasound fragmentation, and protein concentration was determined using Lowry assay (Bio-Rad). Proteins (20 μg) were separated under reducing conditions by SDS-PAGE and transferred to nitrocellulose membrane (Schleider and Schuell). Proteins were immunodetected with specific antibody and then revealed by the ECL method (Pierce). Actin detection served as a control.

Statistical Analysis

Comparisons between two groups of values were carried out by the non-parametric Wilcoxon test. Effect of one factor on three groups of values is measured by the non-parametric ANOVA test called Kruskal-Wallis test. Spearman rank correlation coefficients were calculated to identify interdependence of two variables. P values <0.05 were considered statistically significant. Levels of significance were indicated as follows: * $P < 0.05$, ** $P < 0.01$ and *** $P < 0.001$.

Results

Quantitative Analysis of the Extent of PDLs in MS Spinal Cords

MBP staining of cervical spinal cord sections showed that PDLs formed large areas of incompletely demyelinated white or grey matter that were adjacent to the borders of fully demyelinated plaques (Fig. 1A and Supp. Info. Fig. 3). PDLs were similarly demonstrated in thoracic or lumbar spinal cord sections when performing MOG staining (Supp. Info. Fig. 2). Interestingly, a computerized analysis of four randomly chosen MBP stained spinal cord sections showed that, in a great majority of PDL regions examined, myelin loss progressively decreased from the plaque/PDL interface toward the NAWM (Fig. 1B). A PDL was apposed to all demyelinated plaques analyzed ($n = 25$, except for sections from case MS289, that were demyelinated on the whole spinal cord surface). PDLs covered as much as 42% of the whole transverse spinal cord surface (mean: $16.9 \pm 13.1\%$; Fig. 1C) and in 8 out of 16 MS spinal cords, the cumulative surface covered by plaques and PDLs represented more than 60% of the total

spinal cord surface (Fig. 1C). Interestingly, we did not find any significant correlation between the size of PDLs and the size of associated plaques ($r = -0.35$; $P = 0.11$, Spearman rank correlation test; Fig. 1D). However, PDLs surrounding chronic active plaques tended to cover larger surfaces ($14.9 \pm 3.6\%$ of the whole transverse spinal cord surface) than PDLs associated with chronic silent plaques ($7.8 \pm 2.0\%$) or active plaques ($5.1 \pm 0.7\%$) (Fig. 1E). Finally, when analyzing longitudinal sections or serial transverse sections of MS spinal cords, we found that PDLs did not extend preferentially along the longitudinal axis, as it would have been expected in the case of Wallerian degeneration (Supp. Info. Fig. 3).

Characterization of Myelin Alterations in PDLs

To quantitatively assess the extent of demyelination in PDLs, we compared myelin density in PDLs versus NAWM on MBP stained sections (Fig. 2A,B). We found a mean myelin loss of nearly 44% in PDLs compared with the NAWM (NAWM: 0.71 ± 0.020 ; PDL: 0.39 ± 0.024 ; $P = 2.5 \times 10^{-10}$, Wilcoxon test; Fig. 2C). Axonal density, as assessed by the number of NF^+ axons/ mm^2 , was lower in PDLs ($6,114 \pm 606/\text{mm}^2$) compared with the NAWM ($7,938 \pm 605/\text{mm}^2$; $P = 0.030$, Wilcoxon test; Fig. 2D). However, relative myelin loss predominated over axonal loss in PDLs (44% for myelin loss vs. 16% for axonal loss) and apparently unaltered demyelinated axons were demonstrated (Fig. 2B), indicating again that Wallerian degeneration is not likely to be a primary cause of PDL formation. In addition, the mean diameter of myelinated axons was unchanged in PDLs as compared with the NAWM ($3.1 \pm 0.073 \mu\text{m}$ and $3.3 \pm 0.12 \mu\text{m}$ in the NAWM and PDLs respectively, $P = 0.56$, Wilcoxon test; Fig. 2F). Finally, myelinated axons in PDLs did not have abnormally thin myelin sheaths (Fig. 2E), which confirms that PDLs are distinct from the remyelinated areas previously demonstrated in close vicinity to plaque borders (Patrikios et al., 2006; Prineas and Connell, 1979). To further analyse PDL alterations, mRNA from microdissected PDLs and NAWM were amplified and analyzed on microarrays. As expected, the expression of mature oligodendrocyte gene markers was downregulated in PDLs versus NAWM. Interestingly, the expression of immature oligodendrocyte gene markers was similarly downregulated and, moreover, none of the upregulated genes in PDLs were myelin-related (Table 1).

Identification of an Abnormal Astrocyte Molecular Signature in PDLs

The analysis of microarray data revealed that a set of astrocyte-related genes was constantly and significantly upregulated in PDL samples compared with the adjacent

TABLE 1: Myelin-Related Genes Differentially Expressed in PDL Versus NAWM

Gene symbol	Description	Mean ratio	SD	<i>P</i>
Downregulated				
SIRT2 ^a	Sirtuin 2	0.61	0.15	0.01
NDRG1 ^a	N-myc downstream regulated 1	0.63	0.13	0.01
LPAR1 ^a	Lysophosphatidic acid receptor 1	0.65	0.17	0.01
JAM3	Junctional adhesion molecule C	0.67	0.16	0.01
CLDN11	Claudin 11	0.67	0.18	0.01
NRXN1 ^a	Neurexin 1	0.26	0.20	0.01
OLIG1 ^a	Oligodendrocyte transcription factor 1	0.44	0.20	0.01
MOBP ^a	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	0.45	0.17	0.01
MBP ^a	Myelin basic protein	0.56	0.12	0.01
CNTN2	Contactin 2	0.58	0.23	0.01
FA2H ^a	Fatty acide 2-hydroxylase	0.59	0.14	0.01
KLK6	Kallikrein-related peptidase 6	0.61	0.26	0.02
UGT8	UDP glycosyltransferase 8	0.61	0.27	0.02
MYRF	Myelin regulatory factor	0.62	0.26	0.02
CNP	CNPase	0.64	0.20	0.02
TUBB4	Tubulin beta 4	0.68	0.21	0.02
PLP1 ^a	Proteolipid protein 1	0.71	0.14	0.02
QKI	Protein quaking	0.51	0.34	0.02
NKX2-2	NK2 homeobox 2	0.54	0.38	0.02
GJC2	Connexin 47	0.57	0.30	0.02
MYO5A	Myosin 5 A	0.59	0.35	0.02
BOK	Bcl-2-related ovarian killer protein	0.64	0.48	0.05
SOX8	Transcription factor SOX8	0.69	0.63	0.05
ERMN	Juxtanodin	0.72	0.29	0.05
POU3F2	POU class 3 homeobox 2	0.72	0.38	0.05
Upregulated				
None				

Data are presented as mean ratio values obtained from the paired comparisons of gene expression levels in microdissected PDL versus NAWM regions of eight MS spinal cords. Among the significantly up or downregulated genes in PDL versus NAWM, myelin-related genes were identified using GO ontology and a survey of the literature. Note that no myelin-related genes were identified among upregulated genes. SD: standard deviation.

^aGenes showing significant downregulation in two concurrent methods of analysis (Significant Analysis of Microarray method and Wilcoxon signed rank test). *P* values obtained with the Wilcoxon test are indicated in the right column.

NAWM. These genes included notably aquaporin 4 (AQP4), connexin 43 (Cx43), and the glutamate transporter EAAT1 (Table 2). Using Western blot and immunohistochemistry, we further demonstrated that protein levels of AQP4, Cx43, and EAAT1 gradually decreased from plaques to PDLs and from PDLs to the NAWM (*P* = 0.012

for AQP4, *P* = 0.049 for Cx43, and *P* = 0.055 for EAAT1, Kruskal-Wallis test; Fig. 3). Interestingly, we did not observe an increased expression of GFAP, at the mRNA or protein level (Supp. Info. Fig. 4), indicating that, rather than a classical astrocytosis, subtle astrocyte alterations occur in PDLs.

TABLE 2: Astrocyte-Related Genes Differentially Expressed in PDL Versus NAWM

Gene symbol	Description	Mean ratio	SD	<i>P</i>
Upregulated				
AQP4 ^a	Aquaporin 4	2.06	1.70	0.01
GJA1 ^a	Connexin 43	3.16	3.77	0.01
SLC7A2	Solute carrier family 7 member 2	12.11	14.99	0.01
CPT1A	Carnitine palmitoyltransferase 1A	17.21	13.98	0.01
SLC38A1	Solute carrier family 38 member 1	3.51	4.25	0.01
SPARCL1 ^a	SPARC-like 1 (Hevin)	1.66	0.38	0.01
CD44	CD44	1.73	0.77	0.01
NBN ^a	Nibrin	1.78	0.36	0.01
SLC7A11	Solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain, Xc-system) member 11	38.45	100.57	0.01
PRKAG2	AMP activated protein kinase subunit gamma-2	3.99	5.50	0.01
NTRK3	Tyrosine kinase receptor C (Trk-C)	2.48	1.92	0.02
SLC1A3 ^a	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter) member 3 (GLAST, EAAT1)	1.52	0.48	0.02
AGT	Angiotensinogen	1.71	0.63	0.02
SLC1A2	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter) member 2 (GLT-1, EAAT2)	1.97	1.02	0.02
NTRK2 ^a	TrkB tyrosine kinase	1.98	0.71	0.02
ID4	Inhibitor of DNA binding 4	2.09	1.59	0.04
SERPINE2	Glia-derived nexin	2.10	1.77	0.05
LAMB2	Lamini beta 2	1.64	0.64	0.05
EPHA4	Tyrosine-protein kinase TYRO1	4.71	4.07	0.05
Down regulated				
S100B	S100 calcium binding protein B	0.69	0.36	0.05
SLC25A13	Solute carrier family 25 (aspartate/glutamate carrier). member 13	0.42	0.29	0.01
SLC17A5	Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter). member 5	0.47	0.27	0.01
SH3BP4	Transferrin receptor-trafficking protein	0.52	0.36	0.02

Data are presented as mean ratio values obtained from the paired comparisons of gene expression levels in microdissected PDL versus NAWM regions of eight MS spinal cords. Among the significantly up or downregulated genes in PDL versus NAWM, astrocyte-related genes were identified using GO ontology and a survey of the literature. Note that only four astrocyte-related genes were identified among downregulated genes. SD: standard deviation.

^aGenes showing significant upregulation in two concurrent methods of analysis (Significant Analysis of Microarray method and Wilcoxon signed rank test). *P* values obtained with the Wilcoxon test are indicated in the right column.

Demonstration of a Low-Grade Inflammatory Process in PDLs

We previously showed that in spinal cords from PPMS or SPMS patients, parenchymal CD3⁺ T-cells are sparse, except in active plaques (Androdias et al., 2010). Therefore, we focused our histological analysis on macrophages/microglia and

found a higher density of Iba-1⁺ macrophages/microglia in PDLs (0.061 ± 0.0078) compared with the NAWM (0.036 ± 0.0030 ; $P = 0.0056$, Wilcoxon test; Fig. 4A). Interestingly, the density of macrophages/microglia in PDLs was not correlated with the activity of associated plaques (chronic

TABLE 3: Immune-Related Genes Differentially Expressed in PDL Versus NAWM

Gene symbol	Description	Mean ratio	SD	P
Upregulated				
Complement system				
C1S	Complement component 1, S subcomponent	3.53	2.51	0.01
C4A	Complement component 4A	1.80	0.57	0.01
C4B	Complement component 4B	1.70	0.53	0.01
C7	Complement component 7	3.12	2.50	0.04
CLU	Complement cytolysis inhibitor	2.15	1.15	0.01
CFI	Complement factor I	6.90	13.49	0.02
CD59	CD59 molecule	1.65	1.06	0.02
CD69	CD69 molecule	4.68	4.86	0.02
SERPING1	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	2.35	1.07	0.01
TLR				
TLR5	Toll-like receptor 5	3.53	5.56	0.05
TLR7	Toll-like receptor 7	1.73	1.36	0.02
Cytokines				
IL17D	Interleukin 17D (also known as IL-27)	3.44	3.45	0.01
KITLG	KIT ligand (also known as Stem Cell Factor)	2.71	2.52	0.01
TNFSF13	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13 (APRIL)	1.74	1.20	0.05
Cytokine/chemokine receptors				
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2.64	1.66	0.02
CXCR7	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7	7.19	9.12	0.01
IL17RD	Interleukin 17 receptor D (isoform D of IL17A receptor)	3.62	2.93	0.01
IL13RA1	Interleukin 13 receptor alpha 1	1.53	0.56	0.05
IL1R1	Interleukin 1 receptor, type I	14.71	33.32	0.05
OSMR	Oncostatin M receptor	7.49	15.48	0.05
TGFBR3	Transforming growth factor beta receptor III	7.10	9.29	0.02
TGF- β receptor signaling ^a				
BMPR1A	Bone morphogenetic protein receptor, type IA (ALK3)	4.96	4.18	0.04
BMPR1B	Bone morphogenetic protein receptor, type IB (ALK6)	28.58	75.02	0.02
CUL1	Cullin 1	5.28	8.37	0.01
KLF10	TGFB inducible early growth response	17.27	40.37	0.02
ROCK2	Rho-associated, coiled-coil containing protein kinase 2	1.98	1.13	0.02
SMAD5	SMAD family member 5	1.88	0.71	0.04
SMAD1	SMAD Family Member 1	29.43	69.56	0.02
TAB2	TGF-beta activated kinase 1/MAP3K7 binding protein 2	1.90	1.08	0.01
TGFBI	Transforming growth factor beta induced	4.29	6.92	0.02

TABLE 3: Continued

Gene symbol	Description	Mean ratio	SD	<i>P</i>
Interferon- γ signaling ^a				
GBP1	Guanylate binding protein 1, interferon-inducible	5.29	9.85	0.05
GBP2	Guanylate binding protein 2, interferon-inducible	1.85	0.94	0.05
GBP3	Guanylate binding protein 3	14.66	34.71	0.04
HLA-DRB1,3	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 1, 3	2.13	0.90	0.05
HLA-DRB4,5	Major histocompatibility complex, class II, DR beta 4, 5	2.42	1.61	0.04
SOCS3	Suppressor of cytokine signaling 3	1.85	0.96	0.01
Cell activation				
CD163	CD163	3.21	1.56	0.01
CD44	CD44	1.73	0.76	0.01
CD58	CD58	5.42	4.52	0.04
CD99	CD99	1.70	0.73	0.02
Cell adhesion				
CADM1	Cell adhesion molecule 1	4.14	5.30	0.04
ITGA6	Integrin, alpha 6	2.17	1.17	0.04
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	3.38	2.84	0.02

Data are presented as mean ratio values obtained from the paired comparisons of gene expression levels in microdissected PDL versus NAWM regions of eight MS spinal cords. Among the significantly up or downregulated genes in PDL versus NAWM, immune-related genes were identified using GO ontology and a survey of the literature. A selection of upregulated immune-related genes is presented here. Only few immune-related genes were identified among downregulated genes and are presented in Supporting Information Table 5.

SD: standard deviation.

^aPathways showing significant enrichment using the TargetMine software. *P* values obtained with the Wilcoxon test are indicated in the right column.

silent: 0.056 ± 0.015 ; chronic active: 0.069 ± 0.010 ; active: 0.056 ± 0.0010 ; $P = 0.30$, Kruskal-Wallis test; Fig. 4B). Analysis by confocal microscopy showed that macrophages/microglia were frequently apposed to myelin sheaths and that phagocytosis of myelin debris could occasionally be demonstrated (Fig. 4C). This observation was confirmed by the ORO (Oil red-O) staining of rare macrophages/microglia in PDLs (Supp. Info. Fig. 5). In contrast, phagocytosis of axons was not observed in PDLs (Fig. 4E). Of note, the density of macrophages/microglia negatively correlated with myelin density ($r = -0.57$; $P = 0.0061$; Fig. 4D) but not with axonal density ($r = 0.39$; $P = 0.076$, Spearman rank correlation test; Fig. 4F), indicating that accumulation of macrophages/microglia did not appear to be linked to axonal loss in PDLs.

The microarray gene expression analysis showed that a large set of immune-related genes were identified as upregulated in PDLs versus NAWM (Table 3). In contrast, few immune-related genes were found to be downregulated in PDLs versus NAWM (Supp. Info. Table 5). These data

confirm, at the molecular level, that inflammation predominates in PDLs over the adjacent NAWM. upregulated immune-related genes notably comprised components of the complement system (eg. C1S, C4A, C4B, C7), the HLA-DR beta MHC class II molecule, the Toll-like receptors TLR4 and TLR7, as well as the chemokine receptors CXCR4 and CXCR7. Of note, 3 cytokines were identified as upregulated in PDLs: the anti-inflammatory cytokine IL-27, the mast cell growth factor SCF (Stem Cell Factor) and the B-cell growth and differentiation factor APRIL. Finally, when performing gene enrichment analysis in TargetMine software, we found that the TGF- β signaling pathway ($P = 0.03$) and the Interferon- γ signaling pathway ($P = 0.001$) were enriched in PDLs. Immunostaining and western blots confirmed the upregulation of CXCR4, CD163, and TGF β R3 in PDLs (Fig. 5).

Discussion

Our work shows that in the spinal cord of PPMS and SPMS patients, PDLs represent a unique compartment

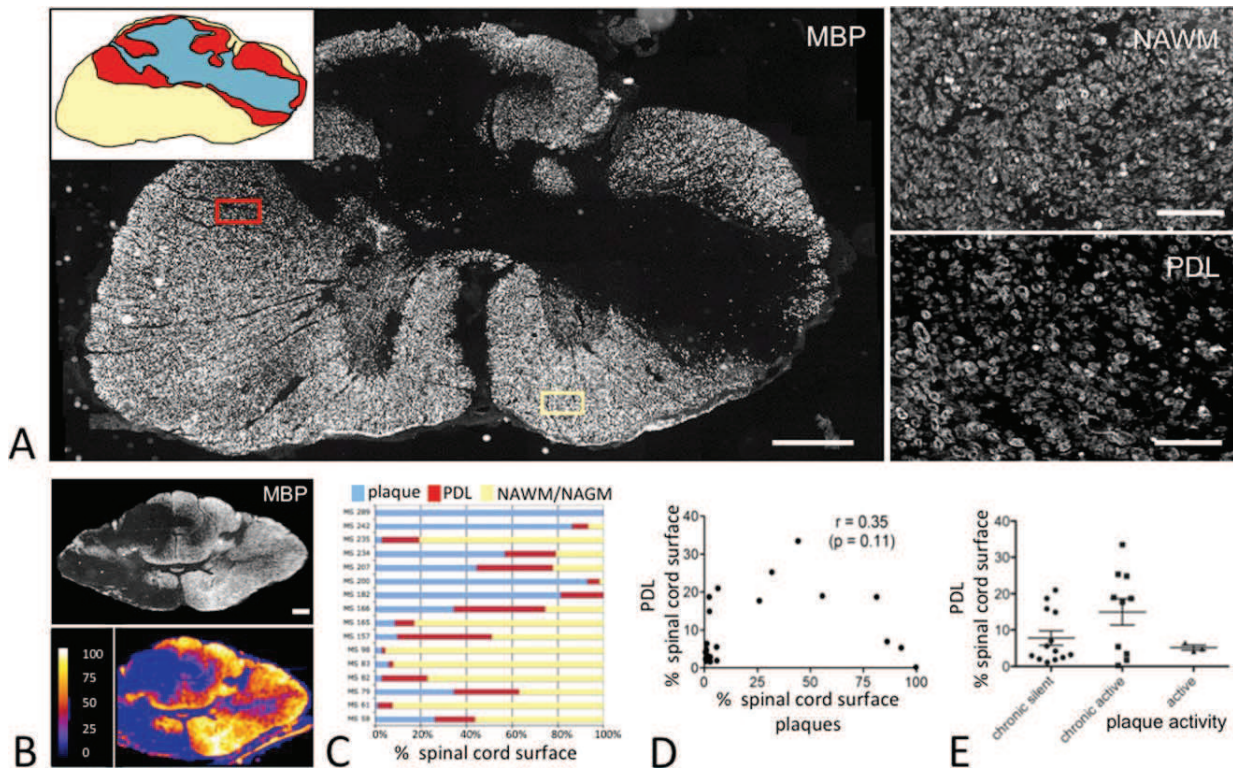


FIGURE 1: Identification of periplaque demyelinated lesions (PDLs) in MS spinal cords. **A.** A mosaic reconstituted photomicrograph of MBP stained transversal spinal cord section from the progressive MS patient MS58 shows the extent of partially demyelinated tissue associated to a fully demyelinated plaque (scale bar: 1 mm). A drawing representing the surfaces covered by plaque (blue) and PDLs (red) is shown in insert. Higher magnification views of the NAWM (yellow square) and PDLs (red square) are shown in right panels (scale bars: 100 μ m). **B.** A mosaic-reconstituted photomicrograph of a MBP stained spinal cord section (MS166) (upper panel, scale bar: 1 mm) was obtained and a fully automated image analysis of MBP density was then performed as described in Materials and Methods (lower panel). A color scale in the lower panel indicates colors corresponding to distinct myelin densities ranging from normal myelin density (NAWM, white) to the absence of myelin staining (plaque, blue). The image shows that in a great majority of PDL regions, myelin loss gradually decreases from the plaque/PDL interface toward the NAWM. Data shown is representative of four fully automated analyses performed on spinal cord sections derived from four distinct MS patients. **C.** Histogram showing the percentage of surface covered by plaques (blue), PDL (red) and NAWM/NAGM (yellow) in spinal cord sections from progressive MS patients. **D.** Dot diagram showing that sizes of PDL (percentage of spinal cord surface covered by PDL) do not correlate with the sizes of associated plaques (percentage of spinal cord surfaces covered by plaques) ($[r\hat{h}\circ] = 0.35$, P value = 0.11). **E.** Dot histogram showing that surfaces covered by PDL do not differ significantly depending on the type of plaque they associate to (P value = 0.36). Note however that larger PDL surfaces associate to chronic active plaques. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

where a specific process of tissue remodelling takes place. We propose that in PDLs, subtle alterations of astrocyte functions are accompanied by low-grade inflammatory events that lead to a progressive loss of myelin and a failure of remyelination.

Areas of incomplete demyelination were previously demonstrated in the periplaques of MS brains or spinal cords (Nijeholt et al., 2001; Zhang et al., 2013b) and were found to translate into a gradual heterogeneity of MRI texture in postmortem studies (Zhang et al., 2013b). In the present study, MBP immunostaining of spinal cord sections showed that PDLs covered unexpectedly large areas relative to the fully demyelinated plaques or to the whole spinal cord surface. Because the spinal cord contains anatomical tracts of major motor and sensory importance, this observation

indicates that spinal cord PDLs are likely to have a significant impact on the neurological status of SPMS and PPMS patients. Supporting this view, a previous study provided evidence that neurological disability in patients with progressive MS correlated with the extent of demyelination in the spinal cord but not in the brain (Bramow et al., 2010). In the present work, we could also demonstrate at the gene and protein level that myelin loss predominated over axonal loss and was not accompanied by significant remyelination in spinal cord PDLs. Indeed, the expression of key genes for mature or immature oligodendrocytes was decreased in PDLs and no morphological signs of remyelination could be observed. In addition, the expression of CD44, an inhibitor of remyelination in chronic MS lesions (Back et al., 2005; Chang et al., 2012), was upregulated in PDLs.

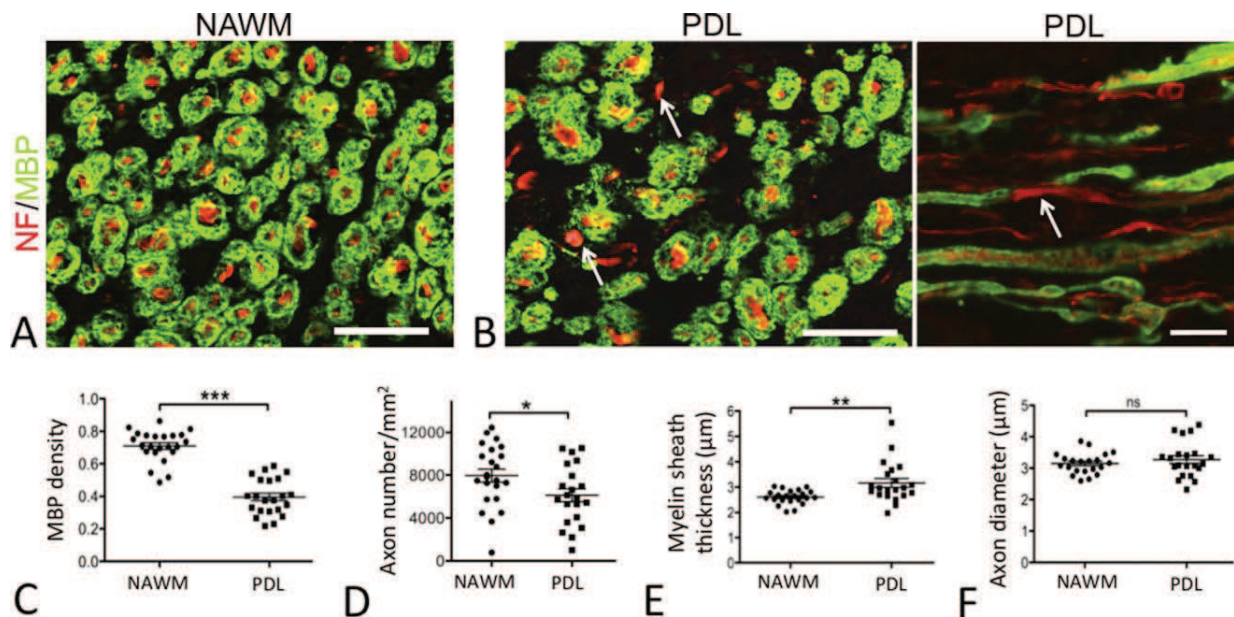


FIGURE 2: Myelin and axonal alterations in the PDL of MS spinal cords. **A, B.** Representative photomicrographs of double immunostainings against MBP (green) and NF (red) performed on spinal cord sections from a progressive MS patient. As compared with the NAWM (**A**), white matter in the PDL (**B**) presents a spongy morphology. Apparently non dystrophic axons are demyelinated (arrows in transversal and longitudinal sections) (scale bar: 25 μm). **C.** Comparison of MBP staining densities in NAWM versus PDL (P value = 2.5×10^{-10}). **D.** Comparisons of mean axonal densities in the NAWM versus PDL (P value = 0.030). **E.** Mean myelin sheath thicknesses of myelinated axons were compared between PDL and NAWM. Mean thicknesses were not found to be lower in PDL as compared with the NAWM, but on the contrary, reached significantly higher values (P value = 0.0029). **F.** Mean axonal diameters of myelinated axons were measured and compared between PDL and NAWM. No difference was observed regarding mean axon diameters (P value = 0.56). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Our data also indicates that a chronic, slowly-progressive inflammatory and demyelinating process takes place in PDLs. Thus, the accumulation of macrophages/microglia correlated with myelin but not axonal loss and phagocytosis of myelin debris, although rare, was readily demonstrated in PDLs. At the molecular level, inflammation in PDLs was characterized by the concomitant expression of pro- and anti-inflammatory signatures, which indicates a chronic rather than acute inflammatory process. In particular, we found that both the TGF- β and the IFN- γ pathways were engaged in PDLs and that upregulated cytokines comprised the pro-inflammatory B-cell growth and differentiation factor APRIL as well as the anti-inflammatory molecule IL-27 (Baker et al., 2010; Hirase et al., 2013; Vincent et al., 2013). Similarly, we observed at the mRNA and protein levels an upregulation of both CD163, a prototypic anti-inflammatory M2-type macrophage marker (Mantovani et al., 2004) and CXCR4, a chemokine receptor playing a major role in macrophages/microglia recruitment and activation (Li and Ransohoff, 2008; Man et al., 2012; Tanabe et al., 1997). The co-existence of pro- and anti-inflammatory molecular signatures was previously reported in the NAWM of brains from PPMS or SPMS patients (Melief et al., 2013; Zeis et al., 2008). The co-expression of M1-type pro-inflammatory and M2-type

anti-inflammatory markers was also recently demonstrated on macrophages/microglia in chronic MS lesions (Fischer et al., 2013; Vogel et al., 2013). Altogether, these studies and ours suggest that chronic inflammation in MS is characterized by a peculiar cytokine milieu that cannot be interpreted on the exclusive basis of pro- versus anti-inflammatory signals. However, one may argue alternatively that successive cycles of pro-versus anti-inflammatory processes could translate into a long-lasting state of priming in macrophages/microglia and, possibly, astrocytes (Cunningham, 2013).

Finally, the present work provides strong evidence that chronic astrocyte alterations occur in spinal cord PDLs. This is indicated by the increased expression of astrocyte-related molecules that were previously demonstrated in chronic MS plaques. These include in particular the glutamate transporters EAAT1 and EAAT2 (Newcombe et al., 2008; Vallejo-Illarramendi et al., 2006), the water channel AQP4 (Misu et al., 2007; Roemer et al., 2007; Sinclair et al., 2007), the neurotrophin receptor TrkB (Colombo et al., 2012), which was recently suggested to be involved in MS-related neurodegeneration (Colombo et al., 2012) and the astrocyte-specific connexin Cx43 (Giaume et al., 2013; Markoullis et al., 2012). Connexins form gap junctions that connect astrocytes into extensive networks and support crucial astrocyte

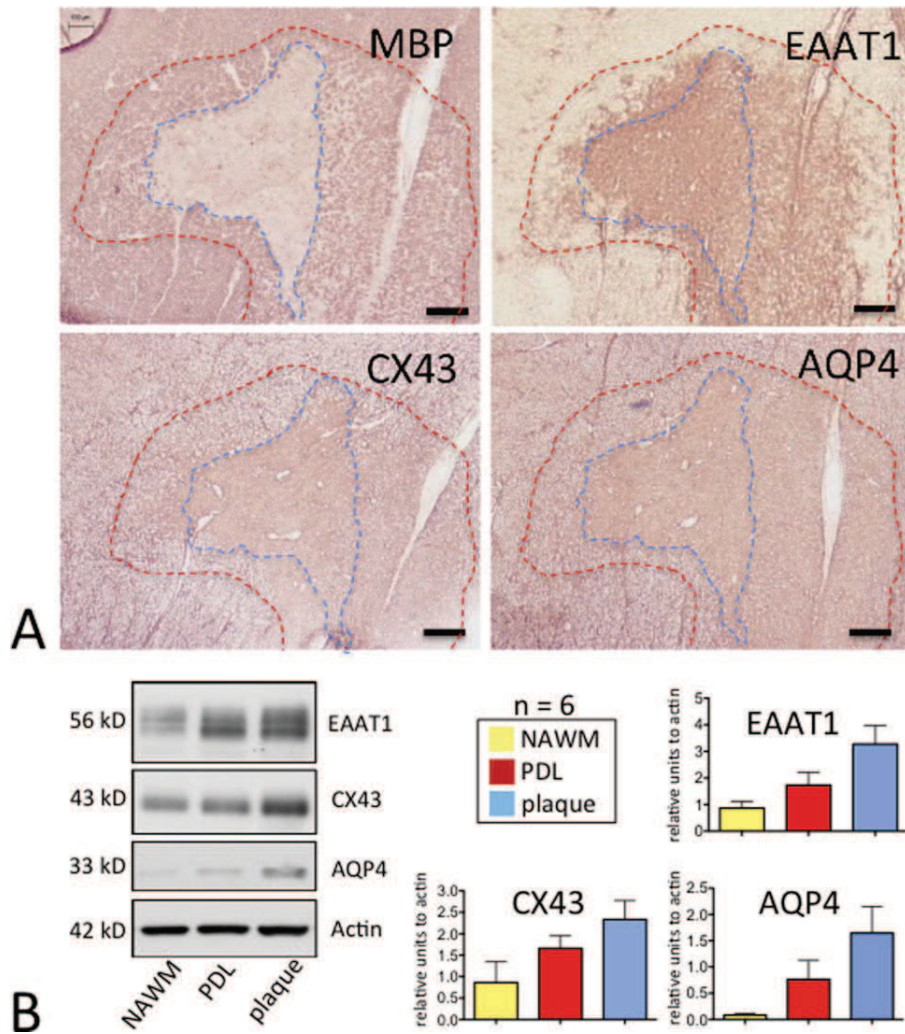


FIGURE 3: Astrocyte activation in PDL of MS spinal cords. **A.** Photomicrographs show MBP, EAAT1, CX43, and AQP4 immunostainings that were performed on adjacent spinal cord sections from the same MS tissue sample. Staining intensities of CX43, AQP4 and especially EAAT1 are more pronounced in PDL (red dashed line) as compared with the NAWM. Up-regulation is even more pronounced when comparing in plaque (blue dashed line) to the NAWM (scale bars: 200 μ m). Data shown are representative of stainings obtained from three MS spinal cord samples. **C.** Representative images of western blot analyses of EAAT1, CX43 and AQP4 expression in plaque, PDL or NAWM tissue samples from the same patient. Graphs indicate quantification of western blots using actin or GAPDH as loading control (ratio to actin or GAPDH) on 6 SPMS patients. Statistical analysis with the Kruskal-Wallis test shows a significant differential expression for EAAT1 (P value = 0.055), Cx43 (P value = 0.049) and AQP4 (P value = 0.012) between plaque, periplaque and NAWM regions. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

functions with regard to neuronal metabolism, oligodendrocyte survival and synaptic transmission (Giaume et al., 2013). Interestingly, the pattern of connexin expression we found in PDLs was recently described in chronic MS plaques (Markoullis et al., 2012). Indeed, while Cx43 was increased, Cx47, the main connexin forming gap junctions between astrocytes and oligodendrocytes (Giaume et al., 2013), was decreased. These data suggest that in PDLs as in chronic MS plaques, an altered expression of connexins may provoke a dysfunction of the astrocyte network and of astrocyte-oligodendrocyte communications via gap junctions. Whether and how such alterations may drive demyelination and/or

prevent remyelination remains to be formally established (Altevogt and Paul, 2004; Lassmann, 2014; Markoullis et al., 2012). Conversely, one has to consider that astrocyte alterations might also be secondary to an ongoing demyelinating process. Besides connexins, the upregulation of AQP4 and glutamate transporters may be interpreted as a protective mechanism possibly triggered by a disturbed water balance and an increased extra-cellular concentration of glutamate in PDL. On the other hand, immune molecules on their own might induce an upregulation of AQP4 and glutamate transporters, which, in turn, might lead to local alterations of glutamate and/or water homeostasis. Supporting this view,

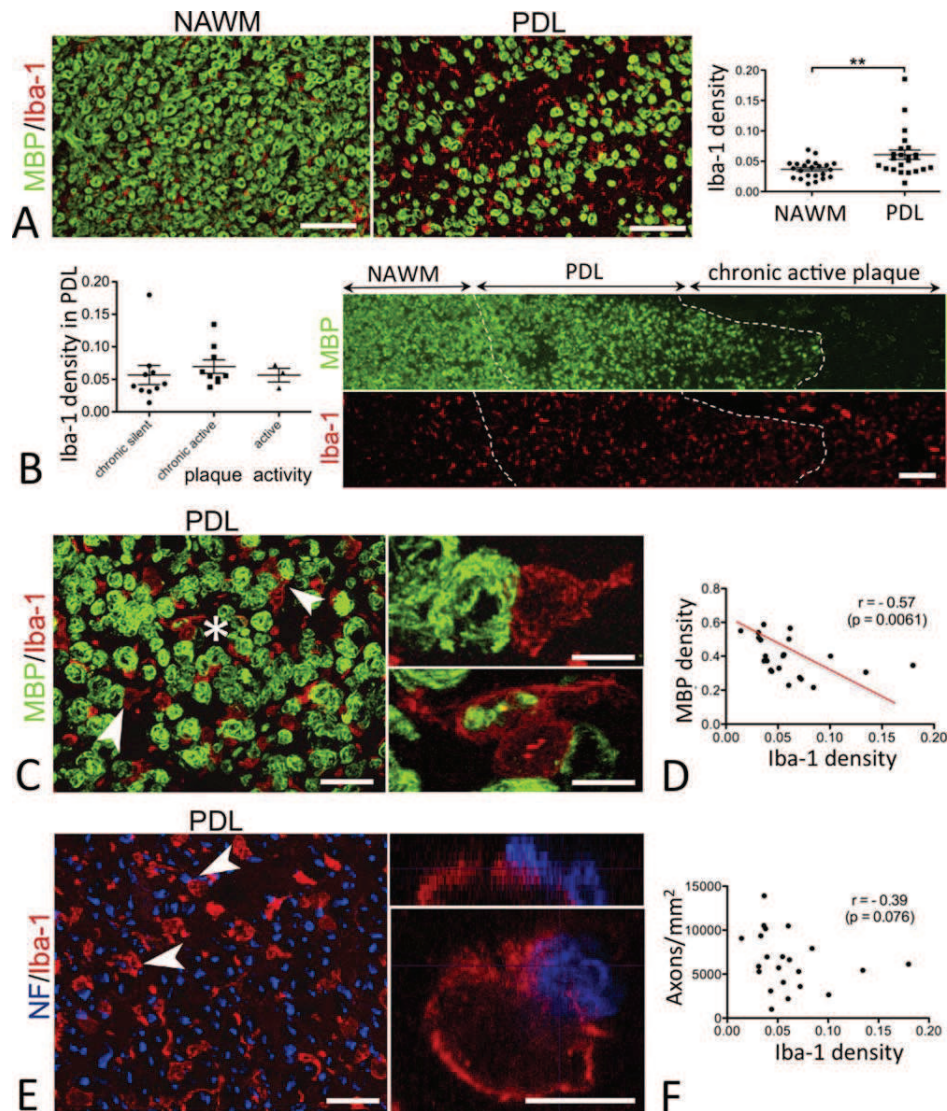


FIGURE 4: Accumulation of macrophages/microglia in the PDL of MS spinal cords. **A.** Photomicrographs show a representative Iba-1 (red)/MBP (green) double immunostaining observed in NAWM and adjacent PDL regions (scale bars: 100 μm). A higher density of macrophages/microglia is observed in PDL as compared with the NAWM (right panel) (P value = 0.0056). **B.** Macrophages/microglia density in the PDL appears independent from the activity of associated plaques (left panel, P value = 0.30). Photomicrograph in right panel shows a representative Iba-1 (red)/MBP (green) double immunostaining of PDL associated to a chronic active plaque (scale bars: 100 μm). Note that fully activated macrophages/microglia with a hypertrophied rounded cell body are observed in plaque borders but not in the PDL. **C.** Photomicrograph in left panel shows a representative view of Iba-1 (red)/MBP (green) double immunostaining in a PDL region (scale bar: 25 μm). Close appositions between Iba-1⁺ macrophage/microglial cells and MBP⁺ myelin sheaths are observed (arrows) and an Iba-1⁺ macrophage/microglial cell having engulfed MBP⁺ myelin debris is demonstrated (star). Right panels show higher magnification views of these areas (scale bar: 10 μm). **D.** Densities of macrophages/microglia and myelin are inversely correlated in PDL ($[r\hat{\theta}] = -0.57$, P value = 0.0061). **E.** Photomicrograph shows a representative Iba-1 (red)/NF (blue) double immunostaining observed in a PDL region. Arrows indicate very close appositions between Iba-1⁺ cells and NF⁺ dystrophic axons (scale bar: 25 μm). A high magnification view of an Iba-1⁺ macrophage/microglial cell in close apposition with a NF⁺ dystrophic axon is shown in insert (scale bar: 10 μm). A z view of the same image (upper right panel) demonstrates close apposition but no engulfment of NF⁺ material by the Iba-1⁺ macrophage/microglial cell. These data indicate that macrophages/microglia do not exert phagocytic activity toward axons in PDL regions. **F.** Densities of macrophages/microglia and axons were neither negatively nor positively correlated in PDLs ($[r\hat{\theta}] = -0.39$, P value = 0.076). [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

several *in vitro* studies showed that astrocytes submitted to pro-inflammatory signals upregulate the expression and/or activity of Cx43 (Bennett et al., 2012; Froger et al., 2010), AQP4 (Asai et al., 2013; Ito et al., 2006) and EAAT2 (Till-

eux et al., 2009). It has also to be underscored that a dysregulation of non-immune functions in astrocytes or astrocyte networks may drive immune alterations in macrophages/microglia (Brosnan and Raine, 2013; Farina et al., 2007;

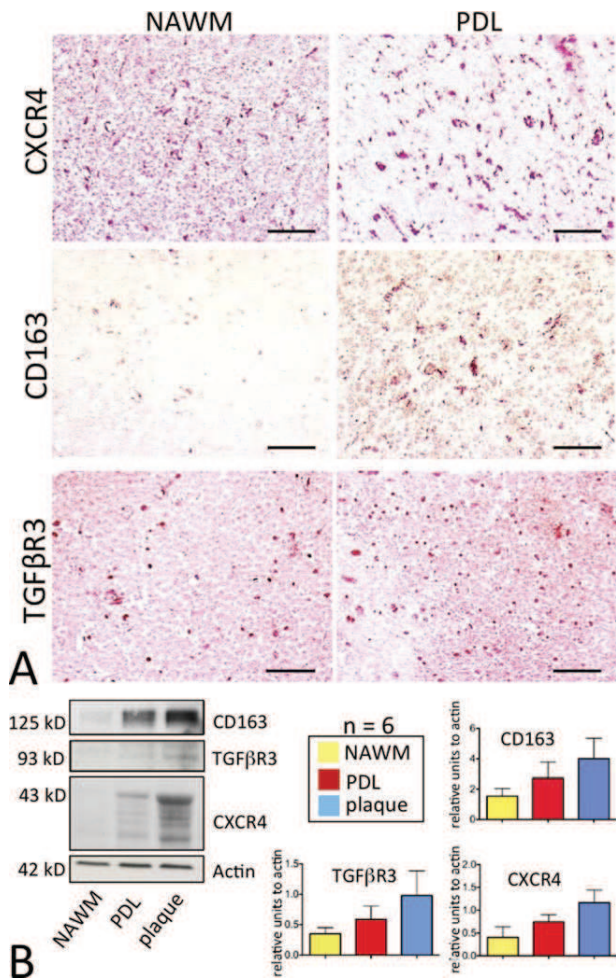


FIGURE 5: Macrophage/microglia activation profile in PDLs of MS spinal cords. **A.** Photomicrographs show representative immunostainings of CXCR4, CD163 and TGFβ3 in PDL versus NAWM regions of spinal cord sections from progressive MS patients (scale bars: 50 μm). A higher density of immunostained cells is observed in PDL as compared with the adjacent NAWM. **B.** Representative images of CD163, TGFβ3, and CXCR4 western blot analyses performed in PDL, adjacent plaque and NAWM tissue samples obtained from a spinal cord MS section. Graphs indicate mean quantifications of western blots performed on samples derived from six SPMS patients and using actin as a loading control. Mean values tended to increase in PDLs versus NAWM and in plaques versus PDLs although differences did not reach statistical significance using the Kruskal-Wallis test. [Color figure can be viewed in the online issue, which is available at wileyonlinelibrary.com.]

Lassmann, 2014; Zhang et al., 2013a). Finally, astrocyte activation in PDLs is characterized by subtle molecular alterations that are not accompanied by an increased expression of GFAP at the mRNA or protein levels nor by any of the classical morphological changes observed in reactive hypertrophic astrocytes. However, in our hands, the immunohistochemical detection of GFAP has been of inconsistent quality in some postmortem MS samples, which raises the possibility that fine

rearrangements of GFAP filament structures might have occurred but were yet not detected.

Low-grade active demyelination in periplaque white matter was previously demonstrated in the brain of SPMS patients (Prineas et al., 2001). Similarly, PDLs in the spinal cord of SPMS patients could represent the slow and extensive expansion of demyelinated lesions that occurs in the absence of acute inflammation. Our work presents possible astrocyte-mediated molecular mechanisms for this expansion and indicates that in PPMS, the development of spinal cord PDLs might result from the same pathophysiological process.

Acknowledgment

Grant sponsor: ARSEP (French MS Research Society) (to S.N. and A.L.); Grant sponsor: MS Society of Great Britain; Grant number: 207495.

The authors thank the “Centre Commun de Quantimétrie” from the University of Lyon for its precious help in analyses by confocal microscope and the genomic facility ProfileXpert-LCMT from the University of Lyon for its precious help in microdissection and microarray experiments. All MS tissue samples used in this study were supplied by the UK Multiple Sclerosis Society Tissue Bank (www.ukmstissuebank.imperial.ac.uk). In memoriam of Pr Confavreux who provided constant support and intellectual input to this work.

References

Altevogt BM, Paul DL. 2004. Four classes of intercellular channels between glial cells in the CNS. *J Neurosci* 24:4313–4323.

Androdias G, Reynolds R, Chanal M, Ritleng C, Confavreux C, Nataf S. 2010. Meningeal T cells associate with diffuse axonal loss in multiple sclerosis spinal cords. *Ann Neurol* 68:465–476.

Asai H, Kakita H, Aoyama M, Nagaya Y, Saitoh S, Asai K. 2013. Diclofenac enhances proinflammatory cytokine-induced aquaporin-4 expression in cultured astrocyte. *Cell Mol Neurobiol* 33:393–400.

Back SA, Tuohy TMF, Chen H, Wallingford N, Craig A, Struve J, Luo NL, Banine F, Liu Y, Chang A, Trapp BD, Bebo BF, Rao MS, Sherman LS. 2005. Hyaluronan accumulates in demyelinated lesions and inhibits oligodendrocyte progenitor maturation. *Nat Med* 11:966–972.

Baker BJ, Park KW, Qin H, Ma X, Benveniste EN. 2010. IL-27 inhibits OSM-mediated TNF-alpha and iNOS gene expression in microglia. *Glia* 58:1082–1093.

Bennett MVL, Garré JM, Orellana JA, Bukauskas FF, Nedergaard M, Sáez JC. 2012. Connexin and pannexin hemichannels in inflammatory responses of glia and neurons. *Brain Res* 1487:3–15.

Bjartmar C, Kidd G, Mörk S, Rudick R, Trapp BD. 2000. Neurological disability correlates with spinal cord axonal loss and reduced N-acetyl aspartate in chronic multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 48:893–901.

Bramow S, Frischer JM, Lassmann H, Koch-Henriksen N, Lucchinetti CF, Sørensen PS, Laursen H. 2010. Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis. *Brain* 133:2983–2998.

Brosnan CF, Raine CS. 2013. The astrocyte in multiple sclerosis revisited. *Glia* 61:453–465.

- Brück W, Kuhlmann T, Stadelmann C. 2003. Remyelination in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 206:181–185.
- Chang A, Staugaitis SM, Dutta R, Batt CE, Easley KE, Chomyk AM, Yong VW, Fox RJ, Kidd GJ, Trapp BD. 2012. Cortical remyelination: A new target for repair therapies in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 72:918–926.
- Charcot J-M. 1865. Sclérose des cordons latéraux de la moelle épinière, chez une femme hystérique, atteinte de contracture permanente des quatre membres. *Bull Mem Soc Med Hop Paris* 11:24–35.
- Colombo E, Cordiglieri C, Melli G, Newcombe J, Krumbholz M, Parada LF, Medico E, Hohlfeld R, Meinel E, Farina C. 2012. Stimulation of the neurotrophin receptor TrkB on astrocytes drives nitric oxide production and neurodegeneration. *J Exp Med* 209:521–535.
- Confavreux C, Compston A. 2006. The natural history of multiple sclerosis. In: Compston A, editor. *McAlpine's multiple sclerosis*, 4th ed. London: Churchill.
- Confavreux C, Vukusic S, Adeleine P. 2003. Early clinical predictors and progression of irreversible disability in multiple sclerosis: An amnesic process. *Brain* 126:770–782.
- Confavreux C, Vukusic S, Moreau T, Adeleine P. 2000. Relapses and progression of disability in multiple sclerosis. *N Engl J Med* 343:1430–1438.
- Cunningham C. 2013. Microglia and neurodegeneration: The role of systemic inflammation. *Glia* 61:71–90.
- Farina C, Aloisi F, Meinel E. 2007. Astrocytes are active players in cerebral innate immunity. *Trends Immunol* 28:138–145.
- Ferguson B, Matyszak MK, Esiri MM, Perry VH. 1997. Axonal damage in acute multiple sclerosis lesions. *Brain* 120:393–399.
- Filippi M, Rocca M. 2010. Dirty-appearing white matter: A disregarded entity in multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 31:389–390.
- Fischer MT, Wimmer I, Höftberger R, Gerlach S, Haider L, Zrzavy T, Hametner S, Mahad D, Binder CJ, Krumbholz M, Bauer J, Bradl M, Lassmann H. 2013. Disease-specific molecular events in cortical multiple sclerosis lesions. *Brain* 136:1799–1815.
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H. 2009. The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132:1175–1189.
- Froger N, Orellana JA, Calvo C-F, Amigou E, Kozoriz MG, Naus CC, Sáez JC, Giaume C. 2010. Inhibition of cytokine-induced connexin43 hemichannel activity in astrocytes is neuroprotective. *Mol Cell Neurosci* 45:37–46.
- Ge Y, Grossman RI, Babb JS, He J, Mannon LJ. 2003. Dirty-appearing white matter in multiple sclerosis: Volumetric MR imaging and magnetization transfer ratio histogram analysis. *AJNR Am J Neuroradiol* 24:1935–1940.
- Giaume C, Leybaert L, C Naus C, C Sáez J. 2013. Connexin and pannexin hemichannels in brain glial cells: Properties, pharmacology, and roles. *Front Pharmacol* 4:88.
- Henderson APD, Barnett MH, Parratt JDE, Prineas JW. 2009. Multiple sclerosis: Distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Ann Neurol* 66:739–753.
- Hirase T, Hara H, Miyazaki Y, Ide N, Nishimoto-Hazuku A, Fujimoto H, Saris CJM, Yoshida H, Node K. 2013. Interleukin 27 inhibits atherosclerosis via immunoregulation of macrophages in mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 305:H420–H429.
- Howell OW, Rundle JL, Garg A, Komada M, Brophy PJ, Reynolds R. 2010. Activated microglia mediate axoglial disruption that contributes to axonal injury in multiple sclerosis. *J Neuropathol Exp Neurol* 69:1017–1033.
- Ito H, Yamamoto N, Arima H, Hirate H, Morishima T, Umenishi F, Tada T, Asai K, Katsuya H, Sobue K. 2006. Interleukin-1 β induces the expression of aquaporin-4 through a nuclear factor- κ B pathway in rat astrocytes. *J Neurochem* 99:107–118.
- 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* 128:2705–712.
- Lassmann H. 2014. Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis. *Glia* 1–15.
- Lassmann H, Brück W, Lucchinetti CF. 2007. The immunopathology of multiple sclerosis: An overview. *Brain Pathol* 17:210–218.
- Li M, Ransohoff RM. 2008. Multiple roles of chemokine CXCL12 in the central nervous system: A migration from immunology to neurobiology. *Prog Neurobiol* 84:116–131.
- Lovas G, Szilágyi N, Majtényi K, Palkovits M, Komoly S. 2000. Axonal changes in chronic demyelinated cervical spinal cord plaques. *Brain* 123:308–317.
- Man S, Tucky B, Coteleur A, Drazba J, Takeshita Y, Ransohoff RM. 2012. CXCL12-induced monocyte-endothelial interactions promote lymphocyte transmigration across an in vitro blood-brain barrier. *Sci Transl Med* 4:1–18.
- Mantovani A, Sica A, Sozzani S, Allavena P, Vecchi A, Locati M. 2004. The chemokine system in diverse forms of macrophage activation and polarization. *Trends Immunol* 25:677–686.
- Markoullis K, Sargiannidou I, Schiza N, Hadjisavvas A, Roncaroli F, Reynolds R, Kleopa K. 2012. Gap junction pathology in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter. *Acta Neuropathol* 123:873–886.
- Melief J, Schuurman KG, van de Garde MDB, Smolders J, van Eijk M, Hamann J, Huitinga I. 2013. Microglia in normal appearing white matter of multiple sclerosis are alerted but immunosuppressed. *Glia* 61:1848–1861.
- Miller DH, Thompson A J, Filippi M. 2003. Magnetic resonance studies of abnormalities in the normal appearing white matter and grey matter in multiple sclerosis. *J Neurol* 250:1407–1419.
- Misu T, Fujihara K, Kakita a, Konno H, Nakamura M, Watanabe S, Takahashi T, Nakashima I, Takahashi H, Itoyama Y. 2007. Loss of aquaporin 4 in lesions of neuromyelitis optica: Distinction from multiple sclerosis. *Brain* 130:1224–1234.
- Moore GRW, Laule C, Mackay A, Leung E, Li DKB, Zhao G, Traboulsee A L, Paty DW. 2008. Dirty-appearing white matter in multiple sclerosis: Preliminary observations of myelin phospholipid and axonal loss. *J Neurol* 255:1802–1811, discussion 1812.
- Newcombe J, Uddin A, Dove R, Patel B, Turski L, Nishizawa Y, Smith T. 2008. Glutamate receptor expression in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 18:52–61.
- Nijeholt GJ, Bergers E, Kamphorst W, Bot J, Nicolay K, Castelijns J a, van Waesberghe JH, Ravid R, Polman CH, Barkhof F. 2001. Postmortem high-resolution MRI of the spinal cord in multiple sclerosis: A correlative study with conventional MRI, histopathology and clinical phenotype. *Brain* 124:154–166.
- Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Brück W, Lucchinetti C, Lassmann H. 2006. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. *Brain* 129:3165–3172.
- Patrucco L, Rojas JI, Cristiano E. 2012. Assessing the value of spinal cord lesions in predicting development of multiple sclerosis in patients with clinically isolated syndromes. *J Neurol* 259:1317–1320.
- Prineas JW, Connell F. 1979. Remyelination in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 5:22–31.
- Prineas JW, Kwon EE, Cho E-S, Sharer LR, Barnett MH, Oleszak EL, Hoffman B, Morgan BP. 2001. Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Ann Neurol* 50:646–657.
- Roemer SF, Parisi JE, Lennon VA, Benarroch EE, Lassmann H, Bruck W, Mandler RN, Weinshenker BG, Pittock SJ, Wingerchuk DM, Lucchinetti CF. 2007. Pattern-specific loss of aquaporin-4 immunoreactivity distinguishes neuromyelitis optica from multiple sclerosis. *Brain* 130:1194–1205.
- Ropele S, Strasser-Fuchs S, Augustin M, Stollberger R, Enzinger C, Hartung HP, Fazekas F. 2000. A comparison of magnetization transfer ratio, magnetization transfer rate, and the native relaxation time of water protons related to relapsing-remitting multiple sclerosis. *AJNR Am J Neuroradiol* 21:1885–1891.
- Seewann A, Vrenken H, Valk P VanDer, Blezer ELA, Knol DL, Castelijns JA, Polman CH, Pouwels PJW, Barkhof F, Geurts JGG. 2009. Diffusely abnormal white matter in chronic multiple sclerosis. *Arch Neurol* 66:601–609.
- Sinclair C, Kirk J, Herron B, Fitzgerald U, McQuaid S. 2007. Absence of aquaporin-4 expression in lesions of neuromyelitis optica but increased

expression in multiple sclerosis lesions and normal-appearing white matter. *Acta Neuropathol* 113:187–194.

Tanabe S, Heesen M, Yoshizawa I, Berman MA, Luo Y, Bleul CC, Springer TA, Okuda K, Gerard N, Dorf ME. 1997. Functional expression. *J Immunol* 159:905–911.

Tilleux S, Goursaud S, Hermans E. 2009. Selective upregulation of GLT-1 in cultured astrocytes exposed to soluble mediators released by activated microglia. *Neurochem Int* 55:35–40.

Trapp BD, Peterson J, Ransohoff RM, Rudick R, Mörk S, Bö L. 1998. Axonal transection in the lesions of multiple sclerosis. *N Engl J Med* 338: 278–285.

Tusher VG, Tibshirani R, Chu G. 2001. Significance analysis of microarrays applied to the ionizing radiation response. *Proc Natl Acad Sci USA* 98:5116–5121.

Vallejo-Illarramendi A, Domercq M, Pérez-Cerdá F, Ravid R, Matute C. 2006. Increased expression and function of glutamate transporters in multiple sclerosis. *Neurobiol Dis* 21:154–164.

Vincent FB, SauleP Easton D, Figgett WA, Fairfax KA, Mackay F. 2013. The BAFF/APRIL system: Emerging functions beyond B cell biology and autoimmunity. *Cytokine Growth Factor Rev* 24:203–215.

Vogel DYS, Vereyken EJJ, Glim JE, Heijnen PD a M, Moeton M, van der Valk P, Amor S, Teunissen CE, van Horsen J, Dijkstra CD. 2013. Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J Neuroinflammation* 10:35.

Vrenken H, Seewann A, Knol DL, Polman CH, Barkhof F, Geurts JJG. 2010. Diffusely abnormal white matter in progressive multiple sclerosis: In vivo quantitative MR imaging characterization and comparison between disease types. *AJNR Am J Neuroradiol* 31:541–548.

Zeis T, Graumann U, Reynolds R, Schaeren-Wiemers N. 2008. Normal-appearing white matter in multiple sclerosis is in a subtle balance between inflammation and neuroprotection. *Brain* 131:288–303.

Zhang F, Yao S-Y, Whetsell WO, Sriram S. 2013a. Astroglial pathology and oligodendroglial pathology are early events in CNS demyelination. *Glia* 61:1261–1273.

Zhang Y, Moore GRW, Laule C, Bjarnason T a, Kozlowski P, Traboulsee A, Li DKB. 2013b. Pathological correlates of magnetic resonance imaging texture heterogeneity in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 74:91–99.

SUPPLEMENTARY DATA

SUPPLEMENTARY MATERIAL AND METHODS

Immunohistology: Only blocks obtained from upper levels (C1-C3) of cervical spinal cords were used for in-depth histological analyses. Briefly, fixed spinal cord sections were incubated overnight at 4°C with one or two of the following primary antibodies diluted in blocking solution: a mouse monoclonal antibody against myelin basic protein (MBP) (MCA70, clone1, 129-138, Serotec; 1:50), a mouse monoclonal antibody against myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG) (clone Z12, UK MS Tissue Bank; 1:50), a rabbit polyclonal antibody against the 200 kDa NF protein (AHP245, Serotec; 1:500), a rabbit monoclonal antibody against the macrophage/microglia marker Iba-1 (Wako; 1:1000), a rabbit polyclonal antibody against Aquaporin 4 (AQP4) (AB2218, Millipore; 1/50), a mouse monoclonal antibody against Connexin 43 (CX43) (clone2, 252-270, BD Biosciences; 1/1000), a rabbit polyclonal antibody against EAAT1 glutamate transporter (522-541; 1/250)(Levy et al., 1995), a rabbit polyclonal against CXCR4 a mouse monoclonal antibody against CD163 (Clone 10D6, Thermo scientific; 1/50) and a rabbit polyclonal against TGFβR3 (AB28366, Abcam; 1/50). Sections were rinsed 3 times in PBS 1X and incubated with a goat anti-mouse or a goat anti-rabbit (Molecular Probes; 1:200) secondary antibody, biotinylated or associated with Alexa fluorochrome 555, 488 or 647 for 1 h 30 min at room temperature. Following another wash in PBS 1X, nuclei were visualized with 4',6-diamine-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI, Roche) staining for immunofluorescence. Slides were finally mounted using Fluoroprep (BioMérieux) and analyzed on a fluorescent microscope (Axioplan II, Zeiss, Munich, Germany) or on a confocal microscope (Leica TCS SP2). Biotinylated secondary antibody was revealed using DAB procedure (DAKO) following manufacturer's instructions. For all immunostainings, controls were performed by omitting the primary antibody.

Automated measures of PDL area: Briefly, images of whole spinal cord sections were segmented in 5 000 mm² squares, in which the density of MBP staining was then calculated and attributed a score ranging from 100% (maximal MBP staining density) to 0% (plaque). A colour code was then applied allowing a graduation of myelin loss to be visualized and a delineation of plaques, PDL and NAWM to be achieved. Using such a fully automated method, we found that for 4 randomly chosen spinal cord sections, the relative sizes of plaques (>80% myelin loss), PDL (25-80% myelin loss) and NAWM were similar to those obtained by hand.

Laser Capture Microdissection: From each fresh frozen tissue sample, 10-µm thick frozen sections were prepared. The sections were mounted on slides (Super Frost Plus; Menzel GmbH, Braunschweig, Germany). The frozen sections were thawed for 30 s and were dehydrated in graded ethanol solutions (75%, 95%, 100%) of 30 s each. Then, the sections were cleared in 3 successive baths of xylene (respectively 2 min 30 s). The slides were kept in a vacuum desiccator for a minimum of 10 min. PDL and NAWM were isolated from the slides using the PixCell II laser capture microdissection system (LCM; Arcturus Engineering). For microdissected section, an adjacent section was MOG immunostained to localize plaque, PDL and NAWM regions. Correct localization was then further ascertained under light microscope examination on the basis of differences in transparency and granularity between plaques, PDL and NAWM (Supplementary Fig. 1). Laser capture was performed by lifting separately PDL and NAWM into HS-CapSure noncontact laser capture microdissection film. After visual control of the completeness of laser microdissection (caps control), the captured tissue is lysed with lysis buffer (Buffer RLT from Qiagen Rneasy Micro Kit).

RNA extraction, amplification and labelling: Total RNA was isolated on silica-based columns, DNase-I digested and eluted with water using the Rneasy Micro kit (Qiagen, France) following the manufacturer's instructions. RNA qualities were assessed on an Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent Technologies, Massy, France). The mean RNA Integrity Number was 6.3. Total RNA (800 pg) was amplified by three rounds of *in vitro* transcription (IVT) using ExpressArt® C&E mRNA amplification pico kit (AmpTec GmbH, Hamburg, Germany). During the last IVT amplification RNA was biotin-labeled using BioArray HighYield RNA Transcript Labeling Kit (Enzo Life Sciences, Inc., Farmingdale, New York, USA). Before amplification, spikes of synthetic mRNA (GeneChip® Eukaryotic Poly-A RNA Controls, Affymetrix, Santa Clara, CA, USA) at different concentrations were added to all samples; these positive controls were used to ascertain the quality of the process. Biotinylated antisense cRNA quantification was performed with a Nanodrop 1000 (Nanodrop, Wilmington, DE, USA) and quality checked with Agilent 2100 Bioanalyzer (Agilent technologies, Inc, Palto Alto, CA, USA).

Microarray hybridization and processing: Hybridization was performed following Affymetrix protocol. Briefly, 10 µg of labeled cRNA was fragmented and denatured in hybridization buffer, then was hybridized on GeneChip® Human Genome U133 plus 2.0 array (Affymetrix) during 16 hours at 45°C with constant mixing by rotation at 60 rpm in the Hybridization Oven 640 (Affymetrix). After hybridization, arrays were washed and stained with streptavidin-phycoerythrin (GeneChip® Hybridization Wash and Stain Kit) in the Fluidics Station 450 (Affymetrix) according to the manufacturer's instruction. The arrays were read with a confocal laser (GeneChip® Scanner 3000 7G, Affymetrix). The CEL files were generated using the Affymetrix GeneChip Command Console (AGCC) software 3.0. The obtained data were normalized with Affymetrix Expression Console software using MAS5 statistical algorithm. The threshold of detection was calculated using the normalized signal intensity of the 100 negative control samples in the array; spots with signal intensities below this threshold were referred to as 'absent'. The quality of processing was evaluated by generating scatter plots of positive signal distribution. The raw data on gene expression in different samples of MS spinal cord are deposited in the Gene Expression Omnibus data repository (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/query/acc.cgi?acc=GSE52139>).

SUPPLEMENTARY TABLES

Supplement Table 1: Demographic and clinical data (histological analyses)

Case	Sex	Age at death	Disease duration	Disease course
MS58	F	51	21	SP
MS61	F	56	15	PP
MS79	F	49	23	SP
MS82	F	49	NA	SP
MS83	M	54	16	PP
MS98	M	57	12	PP
MS157	F	39	22	SP
MS165	F	59	20	SP
MS166	F	52	36	SP
MS182	F	56	33	PP
MS200	F	44	19	SP
MS207	F	46	25	SP
MS234	F	39	15	PP
MS235	M	53	29	SP
MS242	F	57	19	SP
MS289	M	45	18	SP

Age is expressed in years. The 16 MS patients (12 females, 4 males) had a mean age at death of 50.5 +/- 6 years and a mean disease duration of 21.5 +/- 8 years. MS = multiple sclerosis; F = female; M = male; SP = secondary progressive; PP = primary progressive.

Supplement Table 2: Demographic and clinical data (microarray analyses)

Case	Sex	Age at death	Disease duration	Disease course
MS157	F	39	22	SP
MS166	F	52	36	SP
MS207	F	46	25	SP
MS301	F	62	19	SP
MS341	F	52	24	SP
MS402	M	46	20	SP
MS403	F	54	28	SP
MS413	M	61	26	SP

Age is expressed in years. The 8 MS patients (6 females, 2 males) had a mean age at death of 51.5 +/- 8 years and a mean disease duration of 25 +/- 5 years. MS = multiple sclerosis ; F = female ; M = male ; SP = secondary progressive.

Supplement Table 3: SAM up-regulated genes in PDLs versus NAWM.

Gene Symbol	Description	q-value (%)	Mean ratio	SD ratio	Patients for which increases (/8)
GOLM1	Golgi membrane protein 1	0.00	2.08	0.71	8
ABCE1	ATP-binding cassette, sub-family E (OABP), member 1	6.51	1.97	0.57	8
AQP4	Aquaporin 4	6.51	2.06	1.70	8
B3GAT2	Beta-1.3-glucuronyltransferase (glucuronosyltransferase S)	2 6.51	2.05	1.44	8
CPE	Carboxypeptidase E	6.51	2.05	0.68	8
IGFBP7	Insulin-like growth factor binding protein 7	6.51	1.72	0.51	8
IPO8	Importin 8	6.51	1.82	0.54	8
MRPL19	Mitochondrial ribosomal protein L19	6.51	2.95	1.96	8
NBN	Nibrin	6.51	1.788	0.36	8
PDIA6	Protein disulfide isomerase family A, member 6	6.51	1.68	0.47	8
PNMA2	Paraneoplastic antigen MA2	6.51	2.11	0.66	8
PPP3CA	Protein phosphatase 3 (formerly 2B), catalytic subunit, alpha isoform	6.51	4.21	3.56	8
SPARCL1	SPARC-like 1 (hevin)	6.51	1.65	0.38	8
TMEM47	Transmembrane protein 47	6.51	1.95	0.46	8
BAALC	Brain and acute leukemia, cytoplasmic	6.73	1.35	0.20	8
RCN1	Reticulocalbin 1, EF-hand calcium binding domain	7.81	2.34	0.95	8
UXS1	UDP-glucuronate decarboxylase 1	7.81	2.18	0.91	8
PRPS1	Phosphoribosyl pyrophosphate synthetase 1	8.32	1.56	0.49	8
RBM17	RNA binding motif protein 17	8.62	1.90	0.57	8
FOXN3	Forkhead box N3	8.81	1.89	0.73	8
GABARAPL1	GABA(A) receptor-associated protein like 1	8.81	1.41	0.28	8
NAT8L	N-acetyltransferase 8-like (GCN5-related, putative)	8.81	2.07	1.32	8
NTRK2	Neurotrophic tyrosine kinase, receptor, type 2	8.81	1.98	0.70	7
ZHX2	Zinc fingers and homeoboxes 2	8.81	2.61	0.87	8
AK3L1	Adenylate kinase 3-like 1	9.19	1.47	0.25	8
GJA1	Gap junction protein, alpha 1, 43kDa	9.19	3.15	3.77	8
NR2F1	Nuclear receptor subfamily 2, group F, member 1	9.19	2.42	1.22	8
SERPING1	Serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1	9.19	2.35	1.07	8
SLC1A3	Solute carrier family 1 (glial high affinity glutamate transporter), member 3	9.19	1.51	0.47	7
SORBS1	Sorbin and SH3 domain containing 1	9.19	1.60	0.45	7
SCP2	Sterol carrier protein 2	9.37	1.23	0.13	7
ACTR2	ARP2 actin-related protein 2 homolog (yeast)	9.75	1.69	0.47	7
ANK2	Ankyrin 2, neuronal	9.75	2.01	0.74	7
ZFP36L1	Zinc finger protein 36, C3H type-like 1	9.77	1.87	0.55	7

Up-regulated genes obtained after the two-class pairwise Significant Analysis of Microarray (false discovery rate of 10%). Data are presented as mean ratio values of 8 analysed MS patients comparing PDLs to associated NAWM. SD: standard deviation. Last column indicates the number of patients for which expression ratio (PDL/NAWM expression) is superior to 1, which means the number of patients for which the up-regulation is observed.

Supplement Table 4: SAM down-regulated genes in PDLs versus NAWM.

Gene symbol	Description	q-value (%)	Mean ratio	SD ratio	Patients for which decreases (/8)
ANLN	Anillin, actin binding protein	0.00	0.63	0.15	8
CBFA2T2	Core-binding factor, runt domain, alpha subunit 2; translocated to, 2	0.00	0.70	0.09	8
EDF1	Endothelial differentiation-related factor 1	0.00	0.67	0.07	8
MBP	Myelin basic protein	0.00	0.56	0.12	8
MOBP	Myelin-associated oligodendrocyte basic protein	0.00	0.45	0.17	8
NDRG1	N-myc downstream regulated 1	0.00	0.63	0.13	8
NRXN1	Neurexin 1	0.00	0.26	0.20	8
PAQR6	Progesterin and adipoQ receptor family member VI	0.00	0.60	0.12	8
PEX5L	Peroxisomal biogenesis factor 5-like	0.00	0.53	0.16	8
PKP4	Plakophilin 4	0.00	0.52	0.22	7
RAPGEF5	Rap guanine nucleotide exchange factor (GEF) 5	0.00	0.55	0.17	8

RPL37A	Ribosomal protein L37a	3.36	0.72	0.12	8
EEF1A1	Eukaryotic translation elongation factor 1 alpha 1	3.67	0.86	0.08	8
PACS2	Phosphofurin acidic cluster sorting protein 2	4.04	0.55	0.17	8
RPS6	Ribosomal protein S6	4.04	0.84	0.07	8
SCD	Stearoyl-CoA desaturase (delta-9-desaturase)	4.04	0.64	0.16	8
SIRT2	Sirtuin (silent mating type information regulation 2 homolog) 2 (S. cerevisiae)	4.04	0.60	0.15	8
TMEM63A	Transmembrane protein 63A	4.04	0.44	0.12	8
TP53INP2	Tumor protein p53 inducible nuclear protein 2	4.89	0.53	0.17	8
BCAS1	Breast carcinoma amplified sequence 1	5.21	0.55	0.21	8
CINP	Cyclin-dependent kinase 2 interacting protein	5.51	0.66	0.13	8
FTHL5	Ferritin, heavy polypeptide-like 5	5.51	0.71	0.14	8
PDHA1	Pyruvate dehydrogenase (lipoamide) alpha 1	5.51	0.63	0.22	8
PLP1	Proteolipid protein 1	5.51	0.71	0.13	7
OLIG1	Oligodendrocyte transcription factor 1	5.57	0.43	0.20	8
FMNL2	Formin-like 2	6.21	0.61	0.18	8
LPAR1	Lysophosphatidic acid receptor 1	6.21	0.65	0.17	8
MRFAP1	Mof4 family associated protein 1	6.21	0.79	0.10	8
SOX2OT	SOX2 overlapping transcript (non-protein coding)	6.21	0.63	0.15	8
PEA15	Phosphoprotein enriched in astrocytes 15	6.55	0.58	0.16	8
SCCPDH	Saccharopine dehydrogenase (putative)	6.59	0.65	0.16	8
FEZ1	Fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)	6.89	0.55	0.21	8
OTUD7B	OTU domain containing 7B	6.89	0.63	0.14	8
RASSF2	Ras association (RalGDS/AF-6) domain family member 2	6.89	0.50	0.22	8
SAP18	Sin3A-associated protein, 18kDa	6.89	0.65	0.20	8
TMEM59	Transmembrane protein 59	6.89	0.66	0.17	7
TRAK2	Trafficking protein, kinesin binding 2	6.89	0.59	0.25	8
RPS26	Ribosomal protein S26	7.02	0.62	0.12	8
CLTA	Clathrin, light chain (Lca)	7.12	0.67	0.18	7
ASPHD1	Aspartate beta-hydroxylase domain containing 1	7.23	0.49	0.19	8
BVES	Blood vessel epicardial substance	7.23	0.52	0.21	8
LHPP	Phospholysine phosphohistidine inorganic pyrophosphate phosphatase	7.23	0.59	0.18	8
AGFG1	ArfGAP with FG repeats 1	7.54	0.54	0.17	8
DNAH17	Dynein, axonemal, heavy chain 17	7.54	0.40	0.23	8
ITPK1	Inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	7.54	0.66	0.18	8
KIAA1598	KIAA1598	7.54	0.59	0.21	8
MAP4	Microtubule-associated protein 4	7.73	0.72	0.15	8
CNPY2	Canopy 2 homolog (zebrafish)	7.78	0.31	0.22	8
FA2H	Fatty acid 2-hydroxylase	7.81	0.59	0.14	8
NCAM1	neural cell adhesion molecule 1	7.81	0.61	0.14	8
PLEKHB1	Pleckstrin homology domain containing, family B (evectins) member 1	7.81	0.71	0.18	8
SLC17A5	Solute carrier family 17 (anion/sugar transporter), member 5	7.81	0.47	0.27	8
CPD	Carboxypeptidase D	8.07	0.58	0.13	8
PRDX4	Peroxiredoxin 4	8.16	0.58	0.23	8
SPOCK3	Sparc/osteonectin, cwcv and kazal-like domains proteoglycan (testican) 3	8.41	0.49	0.13	8
BACE1	Beta-site APP-cleaving enzyme 1	8.62	0.60	0.22	8
RPL38	Ribosomal protein L38	8.73	0.66	0.14	8
NENF	Neuron derived neurotrophic factor	9.21	0.58	0.19	8
NLGN3	Neurologin 3	9.29	0.56	0.23	8

Down-regulated genes obtained after the two-class pairwise Significant Analysis of Microarray (false discovery rate of 10%). Data are presented as mean ratio values of 8 analysed MS patients comparing PDLs to associated NAWM. SD: standard deviation. Last column indicates the number of patients for which expression ratio (PDL/NAWM expression) is inferior to 1, which means the number of patients for which the down-regulation is observed.

Supplement Table 5: Immune-related genes differentially expressed in PDL versus NAWM.

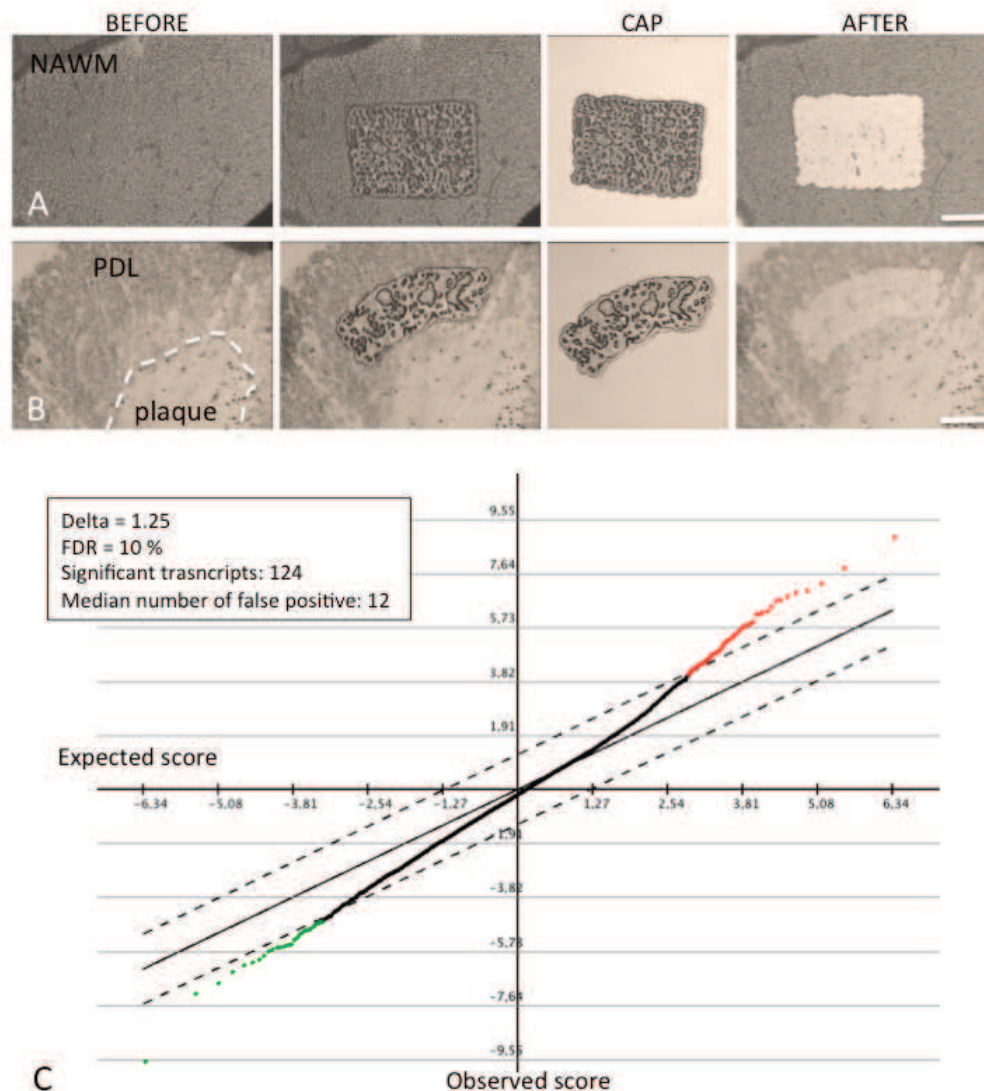
Gene symbol	Description	Mean ratio	SD	p-value
Up-regulated				
ABCF1	TNF-Alpha-Stimulated ABC Protein2	4.09	5.90	0.05
ACTR2	Actin-Related Protein 2	1.69	0.47	0.02
ADCY2	Adenylate Cyclase 2 (Brain)	2.54	2.48	0.01
ANXA1	Annexin A1	3.39	1.62	0.02

APC	Adenomatous Polyposis Coli	3.26	3.10	0.01
ARPC1A	Actin Related Protein 2/3 Complex. Subunit 1A	5.23	8.26	0.01
ATF2	Cyclic AMP-Responsive Element-Binding Protein 2 (CREB2)	1.83	1.00	0.04
BMPR1A	Bone Morphogenetic Protein Receptor. Type IA (ALK3)	4.96	4.18	0.04
BMPR1B	Bone Morphogenetic Protein Receptor. Type IB (ALK6)	28.58	75.02	0.02
BTN3A2	Butyrophilin Protein	5.72	10.78	0.01
C1S	Complement Component 1. S Subcomponent	3.53	2.51	0.01
C4A	Complement Component 4A	1.80	0.57	0.01
C4B	Complement Component 4B	1.70	0.53	0.01
C7	Complement component 7	3.12	2.50	0.04
CADM1	Cell adhesion molecule 1	4.14	5.30	0.04
CANX	Calnexin	2.07	1.00	0.04
CD163	CD163 molecule	3.21	1.56	0.01
CD44	CD44 molecule	1.73	0.76	0.01
CD58	CD58 molecule	5.42	4.52	0.04
CD59	CD59 molecule	1.65	1.06	0.02
CD69	CD69 molecule	4.68	4.86	0.02
CD99	CD99 molecule	1.70	0.73	0.02
CEBPA	CCAAT/Enhancer Binding Protein (C/EBP). Alpha	1.82	1.02	0.02
CFI	Complement Factor I	6.90	13.49	0.02
CLEC4A	C-Type Lectin Domain Family 4. Member A	55.13	88.77	0.02
CLEC5A	Myeloid DAP12-Associating Lectin-1	4.69	3.52	0.04
CLU	Complement Cytolysis Inhibitor	2.15	1.15	0.01
CREB1	CAMP Responsive Element Binding Protein 1 (CREB1)	9.57	14.88	0.02
CUL1	Cullin 1	5.28	8.37	0.01
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	2.64	1.66	0.02
CXCR7	Chemokine (C-X-C motif) receptor 7	7.19	9.12	0.01
CYLD	Cylindromatosis (Turban Tumor Syndrome)	4.08	5.24	0.02
EDNRA	Endothelin Receptor Type A	56.51	131.33	0.02
EDNRB	Endothelin Receptor Type B	3.30	4.21	0.01
FN1	Fibronectin 1	2.09	1.32	0.04
FYB	FYN Binding Protein	14.97	34.86	0.04
GBP1	Guanylate Binding Protein 1. Interferon-Inducible	5.29	9.85	0.05
GBP2	Guanylate Binding Protein 2. Interferon-Inducible	1.85	0.94	0.05
GBP3	Guanylate Binding Protein 3	14.66	34.71	0.04
GIMAP1	GTPase. IMAP Family Member 1	4.68	5.08	0.04
HIPK1	Homeodomain Interacting Protein Kinase 1	1.55	0.79	0.04
HIST1H4E	Histone Cluster 1. H4e	1.77	0.84	0.04
HLA-DRB1.3	Major histocompatibility complex. class II. DR beta 1. 3	2.13	0.90	0.05
HLA-DRB4.5	Major histocompatibility complex. class II. DR beta 4. 5	2.42	1.61	0.04
HOXB6	Homeobox B6	2.44	2.39	0.02
HSPA1A/B	Heat Shock 70kDa Protein 1A/B	1.73	0.57	0.02
IL13RA1	Interleukin 13 receptor. alpha 1	1.53	0.56	0.05
IL17D	Interleukin 17D	3.44	3.45	0.01
IL17RD	Interleukin 17 receptor D	3.62	2.93	0.01
IL1R1	Interleukin 1 receptor. type I	14.71	33.32	0.05
IRS1	Insulin Receptor Substrate 1	2.35	1.98	0.05
ITGA6	Integrin. Alpha 6	2.17	1.17	0.04
ITPKB	Inositol-Trisphosphate 3-Kinase B	1.71	0.79	0.04
JAK3	Janus Kinase 3	1.86	1.16	0.05
KITLG	KIT Ligand	2.71	2.52	0.01
KLF10	TGF β Inducible Early Growth Response	17.27	40.37	0.02
KLF6	Kruppel-Like Factor 6	3.30	3.88	0.04
MAPK10	Mitogen-Activated Protein Kinase 10	1.51	0.58	0.04
NLRP1	NLR Family. Pyrin Domain Containing 1	2.83	3.86	0.02
NPEPPS	Aminopeptidase Puromycin Sensitive	2.75	1.83	0.01
OSMR	Oncostatin M Receptor	7.49	15.48	0.05
OSTM1	Osteopetrosis Associated Transmembrane Protein 1	2.34	1.23	0.01
PAK1	P21 Protein (Cdc42/Rac)-Activated Kinase 1	4.85	5.58	0.02
PBX1	Pre-B-Cell Leukemia Homeobox 1	1.80	0.74	0.01
PCID2	PCI Domain Containing 2	3.17	3.21	0.05
PLSCR1	Phospholipid Scramblase 1	3.39	2.53	0.01
PPP3CA	Protein Phosphatase 3. Catalytic Subunit. Alpha Isozyme	4.22	3.56	0.01
PRKX	Protein Kinase. X-Linked	3.96	3.12	0.05
PROS1	Protein S (Alpha)	7.39	13.92	0.04
PSMA1	Proteasome (Prosome. Macropain) Subunit. Alpha Type. 1	1.96	0.86	0.02
PSMA2	Proteasome (Prosome. Macropain) Subunit. Alpha Type. 2	3.66	4.23	0.05
PTPRC	Protein Tyrosine Phosphatase. Receptor Type. C (CD45)	2.31	1.94	0.05
PTPRO	Protein Tyrosine Phosphatase. Receptor Type. O	11.59	19.27	0.01
RAB27A	RAB27A. Member RAS Oncogene Family	9.99	22.73	0.04

ROCK2	Rho-Associated. Coiled-Coil Containing Protein Kinase 2	1.98	1.13	0.02
RORA	RAR-Related Orphan Receptor A	2.98	2.60	0.02
SEC23A	Sec23 Homolog A (S. Cerevisiae)	2.93	1.87	0.02
SERPINA3	Serpin Peptidase Inhibitor. Clade A	2.12	1.55	0.04
SERPING1	Serpin peptidase inhibitor. clade G (C1 inhibitor). member 1	2.35	1.07	0.01
SH3GL2	SH3-Domain GRB2-Like 2. Endophilin 1	2.81	2.11	0.02
SIN3A	SIN3 Transcription Regulator Homolog A	2.24	1.58	0.04
SLC7A11	Solute carrier family 7 (anionic amino acid transporter light chain. Xc-system) member 11	38.45	100.57	0.01
SLC7A2	Solute carrier family 7 member 2	12.11	14.99	0.01
SMAD1	SMAD Family Member 1	29.43	69.56	0.02
SMAD5	SMAD Family Member 5	1.88	0.71	0.04
SOCS3	Suppressor Of Cytokine Signaling 3	1.85	0.96	0.02
SOD2	Superoxide Dismutase 2. Mitochondrial	4.66	3.83	0.02
SOS1	Son Of Sevenless Homolog 1	1.81	0.81	0.05
SOX6	Transcription Factor SOX-6	6.76	14.10	0.04
SP3	Sp3 Transcription Factor	3.71	3.05	0.01
SRPK2	SRSF Protein Kinase 2	4.07	3.11	0.04
SYNCRIP	Synaptotagmin Binding. Cytoplasmic RNA Interacting Protein	2.12	0.99	0.02
TAB2	TGF-Beta Activated Kinase 1/MAP3K7 Binding Protein 2	1.90	1.08	0.01
TGFBI	Transforming growth factor. beta-induced	4.29	6.92	0.02
TGFBR3	Transforming growth factor. beta receptor III	7.10	9.29	0.02
TIPARP	TCDD-Inducible Poly(ADP-Ribose) Polymerase	3.25	3.27	0.05
TLR5	Toll-like receptor 5	3.53	5.56	0.05
TLR7	Toll-like receptor 7	1.73	1.36	0.02
TMEM176B	Transmembrane Protein 176B	1.50	0.44	0.04
TNFSF13	Tumor Necrosis Factor (Ligand) Superfamily. Member 13	1.74	1.20	0.05
TRIL	TLR4 Interactor With Leucine Rich Repeats	2.78	2.07	0.02
TWSG1	Twisted Gastrulation Protein Homolog 1	1.84	1.16	0.02
TXNIP	Thioredoxin Interacting Protein	2.20	1.28	0.01
VCAM1	Vascular cell adhesion molecule 1	3.38	2.84	0.02
WASL	Neural Wiskott-Aldrich Syndrome Protein	2.59	3.55	0.04
ZEB1	Zinc Finger E-Box Binding Homeobox 1	1.55	0.59	0.04
ZFP36L1	ZFP36 Ring Finger Protein-Like 1	1.87	0.56	0.02
ZNF175	Zinc Finger Protein 175	4.53	5.46	0.01
Down-regulated				
ARIH2	Ariadne Homolog 2 (Drosophila)	0.68	0.34	0.05
ATP1B1	ATPase, Na ⁺ /K ⁺ Transporting, Beta 1 Polypeptide	0.67	0.28	0.04
ATP6V1H	ATPase, H ⁺ Transporting. Lysosomal 50/57kDa, V1 Subunit H	0.42	0.26	0.01
CDC42	Cell Division Cycle 42	0.75	0.35	0.04
CHST2	Carbohydrate (N-Acetylglucosamine-6-O) Sulfotransferase 2	0.65	0.45	0.05
CLTA	Clathrin, Light Chain A	0.67	0.18	0.02
CXADR	Coxsackie Virus And Adenovirus Receptor	0.39	0.33	0.01
ERBB3	V-Erb-B2 Erythroblastic Leukemia Viral Oncogene Homolog 3 (Avian)	0.65	0.28	0.02
FKBP1A	Immunophilin FKBP12	0.63	0.28	0.01
GAB1	GRB2-Associated Binding Protein 1	0.75	0.31	0.04
GNL1	Guanine Nucleotide Binding Protein-Like 1	0.53	0.45	0.02
HRAS	V-Ha-Ras Harvey Rat Sarcoma Viral Oncogene Homolog	0.53	0.25	0.01
JAM3	Junctional Adhesion Molecule 3	0.67	0.16	0.01
MGLL	Monoglyceride Lipase	0.73	0.35	0.05
OSBPL1A	Oxysterol Binding Protein-Like 1A	0.73	0.26	0.04
OTUD7B	Cellular Zinc Finger Anti-NF-Kappa-B Protein	0.63	0.14	0.01
PFDN1	Prefoldin Subunit 1	0.69	0.20	0.02
PIP4K2A	Phosphatidylinositol-5-Phosphate 4-Kinase, Type II, Alpha	0.64	0.21	0.02
PTPN1	Protein Tyrosine Phosphatase. Non-Receptor Type 1	0.72	0.21	0.02
PTPRO	Protein Tyrosine Phosphatase, Receptor Type, O	0.72	0.30	0.04
PXK	PX Domain Containing Serine/Threonine Kinase	0.58	0.30	0.02
RPS6KA2	MAP Kinase-Activated Protein Kinase 1c	0.71	0.20	0.02
S100A13	S100 Calcium Binding Protein A13	0.67	0.24	0.04
S100B	S100 Calcium Binding Protein B	0.69	0.36	0.05
SEC61A2	Sec61 Alpha 2 Subunit (S. Cerevisiae)	0.64	0.34	0.02
SEMA4D	Sema Domain. Immunoglobulin Domain (Ig), Transmembrane Domain (TM) And Short Cytoplasmic Domain, (Semaphorin) 4D	0.57	0.30	0.01
SLC16A3	Solute Carrier Family 16, Member 3 (Monocarboxylic Acid Transporter 4)	0.58	0.36	0.02
SP1	Sp1 Transcription Factor	0.71	0.17	0.02
SP3	Sp3 Transcription Factor	0.42	0.43	0.02
SRPK1	SRSF Protein Kinase 1	0.68	0.36	0.02
SYNCRIP	Synaptotagmin Binding, Cytoplasmic RNA Interacting Protein	0.66	0.31	0.04

Data are presented as mean ratio values obtained from the paired comparisons of gene expression levels in microdissected PDL vs NAWM regions of 8 MS spinal cords. Among the significantly up or down-regulated genes in PDL vs NAWM, immune-related genes were identified using GO ontology and a survey of the literature. p-values obtained with the Wilcoxon test are indicated in the right column.

SUPPLEMENTARY FIGURES



Supplement Figure 1: Laser capture microdissection and microarray analyses of PDL vs. NAWM gene expression. **A, B.** For each microdissected section, an adjacent section was MOG-immunostained to localize plaque, PDL and NAWM regions. Correct localization was then further ascertained under light microscope examination on the basis of differences in transparency and granularity between plaques, PDLs and NAWM. Photomicrographs illustrate the microdissection process in case MS301 for NAWM area in A and periplaque area in B (left panels: before sampling ; middle panels: microdissection and tissue harvest into the cap ; right panels: after sampling). Scale bars: 100 μ m. **C.** Diagram representing results from microarray analysis using the two-class pairwise Significant Analysis of Microarray (SAM) method (false discovery rate of 10%). 124 out of 13 546 transcripts present in PDLs and/or NAWM have a significant differential expression when comparing PDL and NAWM samples. 38 transcripts were up-regulated (green) in PDLs vs. NAWM. 86 transcripts were down-regulated (red) in PDLs vs. NAWM. Complete lists of these transcripts are given in supplementary tables 3 and 4.



cervical



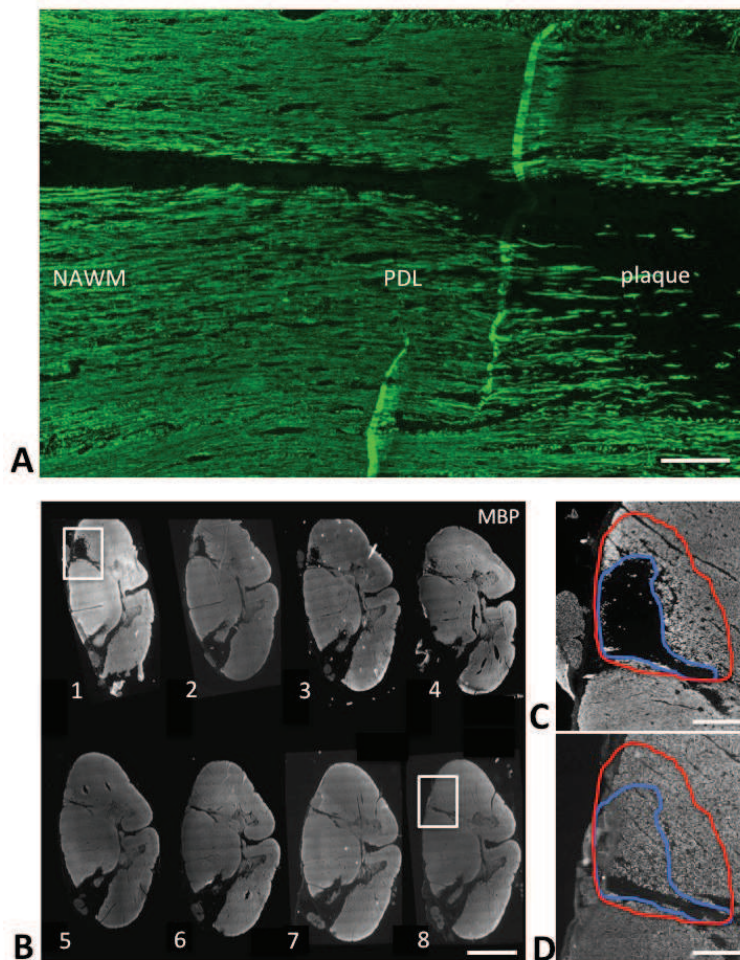
thoracic



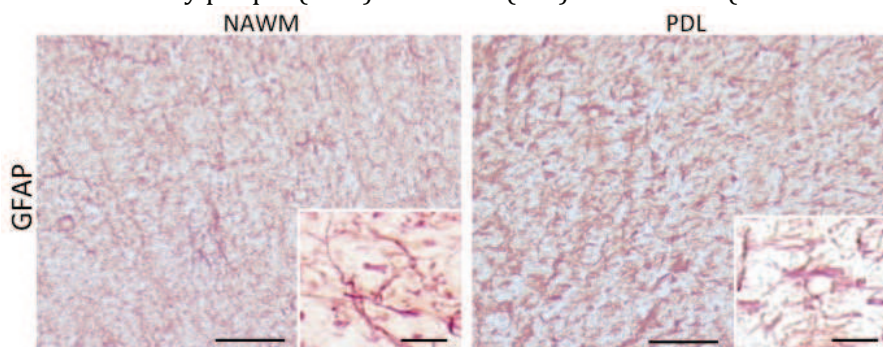
lumbar



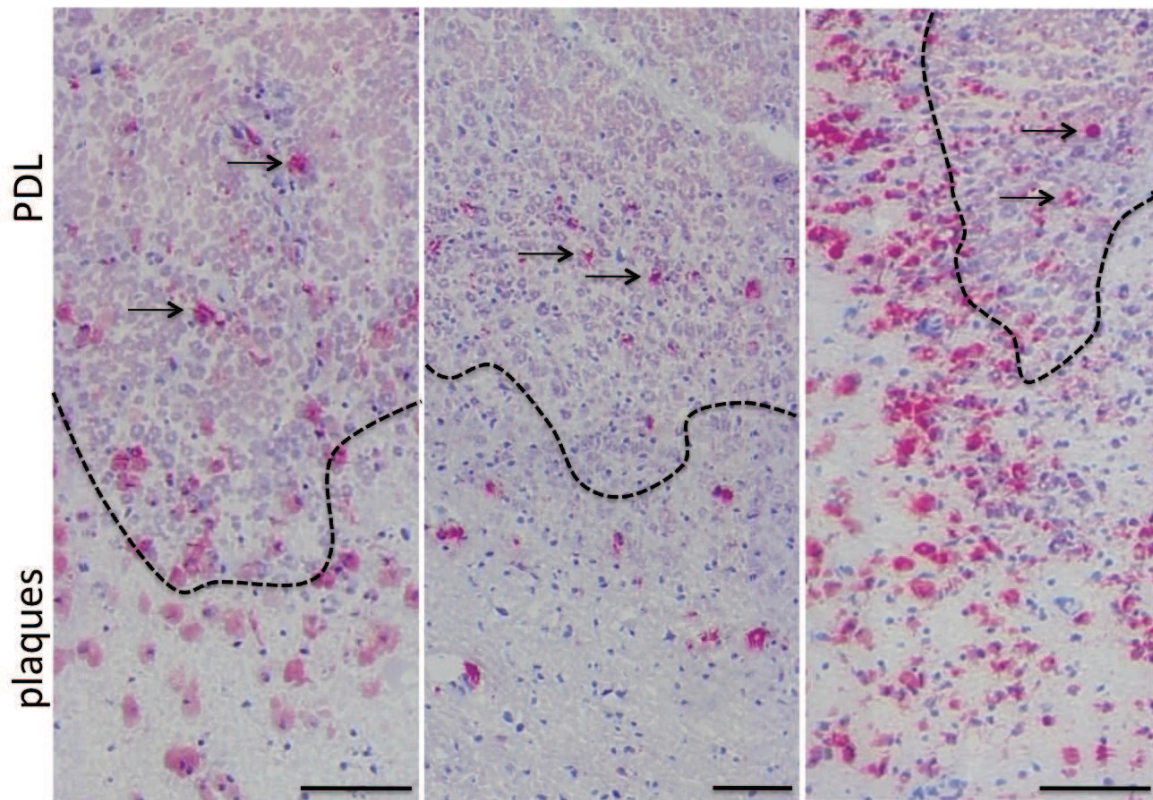
Supplement Figure 2: In a separate set of experiments, spinal cord blocks obtained from 3 distinct levels (cervical, thoracic and lumbar) were screened for the presence of plaques and PDLs. Sections from a total of 91 spinal cord blocks obtained from 26 MS patients (SPMS or PPMS) were immunostained against MOG. We found that, in a majority of patients (22 out of 26), plaques and PDLs could be observed in all 3 levels or at least 2 distinct levels of the spinal cord. Photomicrographs show representative MOG stainings of cervical, thoracic or lumbar spinal cords derived from patient MS157 (scale bar: 2 mm).



Supplement Figure 3: A. Due to the tract anatomy of the spinal cord, we considered that secondary Wallerian degeneration should be much more extensively seen in longitudinal vs. transverse sections. We thus performed longitudinal sections of a cervical block from which transverse sections had shown the presence of PDLs (patient MS235). A mosaic reconstituted photomicrograph of an MBP-stained longitudinal section shows that PDL covers a limited surface and does not appear to extend predominantly in the longitudinal axis of the spinal cord (scale bar: 500 μ m). B. To further demonstrate that PDLs do not systemically extend longitudinally along spinal cord tracts, serial transverse sections were performed on a cervical block (patient MS165). Eight 12 μ m-thick sections were performed every each 168 μ m and were MBP-stained. Low magnification views of mosaic-reconstituted photomicrographs show a plaque that extends longitudinally from section 1 to section 4 (scale bar: 2 mm). C, D. High magnification views of plain squares delineated in section 1 (C) and section 8 (D) (distant each other from 1200 μ m) show that in section 8 (D) myelin staining appears normal in the areas covered by plaque (blue) and PDLs (red) in section 1 (scale bar: 500 μ m).



Supplement Figure 4: Photomicrographs of a GFAP-stained spinal cord section from a progressive MS patient are shown in NAWM and PDLs (scale bars: 50 μ m). Higher magnification views are shown in insert (scale bars: 5 μ m). At the mRNA level, our microarray analysis showed that GFAP is not differentially expressed in PDLs vs. NAWM (ratio PDL/NAWM = 2.11 \pm 1.16, p = 0.07).



Supplement Figure 5: Photomicrographs show examples of Oil-Red O (ORO) stainings obtained on cervical spinal cord sections from 3 MS cases (scale bars: 100 μm). Dashed lines indicate the border of demyelinated plaques. Arrows point to ORO-positive cells localized in PDLs. Briefly, snap frozen spinal cord sections were fixed with 10% formalin for 10 min and washed in running water. Sections were then treated with 60% triethyl phosphate for few seconds and incubated in ORO solution for 15 min. Sections are first rinsed in 60% triethyl phosphate and in running tap water, counterstained in haematoxylin for 10 min, rinsed in tap water and mounted.

