



**HAL**  
open science

# Etude de la réponse lymphocytaire contre le recepteur au N-Méthyl-D-Aspartate dans un modèle murin d'encéphalite autoimmune

Léonie Leseq

► **To cite this version:**

Léonie Leseq. Etude de la réponse lymphocytaire contre le recepteur au N-Méthyl-D-Aspartate dans un modèle murin d'encéphalite autoimmune. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2022. Français. NNT : 2022NORMC409 . tel-03880634

**HAL Id: tel-03880634**

**<https://theses.hal.science/tel-03880634>**

Submitted on 1 Dec 2022

**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.



Normandie Université

## THÈSE

**Pour obtenir le diplôme de doctorat**  
**Spécialité SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE**  
**Préparée au sein de l'Université de Caen Normandie**

### **Etude de la réponse lymphocytaire contre le récepteur au N-Méthyl-D-Aspartate dans un modèle murin d'encéphalite autoimmune**

**Présentée et soutenue par**  
**LEONIE LESEC**

**Thèse soutenue le 08/11/2022**  
**devant le jury composé de**

MME LAURE MICHEL	Maître de conférences, praticien hosp., Centre Hospitalier Universitaire de Rennes	Rapporteur du jury
MME VIOLETTA ZUJOVIC	Chargé de recherche, Institut du Cerveau	Rapporteur du jury
MME HÉLÈNE ZEPHIR	Professeur des universités PraticienHosp, Centre Hospitalier Universitaire de de Lille	Membre du jury
M. DENIS VIVIEN	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Caen Normandie	Président du jury
M. OLIVIER TOUTIRAIS	Maître de conférences, praticien hosp., Université de Caen Normandie	Directeur de thèse
MME BRIGITTE LE MAUFF	Professeur des universités PraticienHosp, Université de Caen Normandie	Co-directeur de thèse

**Thèse dirigée par OLIVIER TOUTIRAIS (Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques) et BRIGITTE LE MAUFF (Physiopathologie et imagerie des troubles neurologiques)**



UNIVERSITÉ  
CAEN  
NORMANDIE



Normandie de Biologie Intégrative,  
Santé, Environnement

PhIND



PHYSIOPATHOLOGY  
& IMAGING OF  
NEUROLOGICAL DISORDERS



## Remerciements

Tout d'abord, je souhaite remercier le Pr Denis Vivien de m'avoir accueillie au sein son unité PhIND depuis mon master 2. Merci pour les moyens mis à notre disposition nous permettant de travailler dans les meilleures conditions.

Je souhaite remercier chaleureusement le Dr Laure Michel et le Dr Violetta Zujovic pour avoir accepté d'être rapporteur de cette thèse. Je remercie également le Pr Hélène Zéphir pour avoir accepté d'être examinatrice de ce travail. C'est un honneur de vous compter toutes 3 parmi les membres de mon jury.

Merci Olivier, mon directeur de thèse et encadrant depuis mon master 2. Malgré le fait que tu sois au CHU et moi à Cyceron cette distance ne s'est jamais fait sentir. Tu as été pour moi un très bon encadrant, à la fois présent pour des points réguliers et me laissant également l'espace dont je pouvais parfois avoir besoin. Merci pour ta disponibilité et merci pour la confiance que tu m'as accordé.

Merci Brigitte, ma co-directrice de thèse. Merci pour ton encadrement durant ces 3 dernières années et durant la rédaction de ce manuscrit. J'ai apprécié ton attention particulière et ta minutie dans l'écriture qui vont, je pense, m'être profitable pour la suite. Je voulais également te remercier pour m'avoir répondu favorablement la première fois où je t'ai contacté ce qui m'a permis de réaliser mon master 2 puis cette thèse de sciences.

Je souhaite remercier mes amis rencontrés au cours du M2, collègues de bureau ou non, membres de PhIND ou de Cervoxy. Ces 4 années passées à vos côtés sont riches en souvenirs et fous rires.

Jo, merci pour ton aide précieuse sur les manips mais surtout pour ta bonne humeur (presque) constante ! Merci pour tous les moments partagés au bureau ou autour d'un café à échanger sur tout et rien, de l'avancée de nos thèses jusqu'au micro climat qui règne sur ce labo ... !



Fatima, l'infidèle de Cervoxy qui se mélange aux gens de PhIND ! Merci pour ton soutien et tous ces moments à l'intérieur comme à l'extérieur du labo. Le feuilleton de ta vie nous aura bien fait rigoler ! Je te souhaite de réussir cette passerelle à venir.

Charlène, sûrement la plus posée d'entre nous mais surtout celle qu'on aura le plus vue diffuser ses travaux. Bravo pour tes présentations, articles, modélisations 3D, mais également pour tes macarons et cookies !

Caro, ta façon de parler est juste magique. Tu nous auras tellement fait rire avec tes réflexions spontanées. Je te souhaite un bon voyage et une belle carrière aux US.

Nakougou et Hélène, ça été un plaisir de partager ce bureau avec vous que ce soit pour échanger sur les manips ou sur nos vies. Je vous souhaite que des bonnes choses pour la suite.

Amandine, il est très probable que tu ne lises jamais ceci mais merci pour ton soutien tout au long de cette thèse. Tu es présente pour tout le monde et il est temps de penser à toi maintenant !

Célia, c'est sûrement avec toi que j'ai passé le plus de temps à manipuler au labo. Je ne compte plus les moments passés en cytométrie à regarder les tubes ou au L2 à compter des cellules. Je pense pouvoir dire que nous avons poussé l'optimisation à son maximum ! Ça a été un plaisir de manipuler avec toi, toujours dans la simplicité et la bonne humeur. Je te souhaite que des bonnes choses pour la suite. La recherche c'est fait pour toi !

Merci à l'ensemble de l'équipe PhIND et de Cyceron. Merci à tous ceux qui ont participé de près ou de loin à cette thèse, Véronique, Carine, Sandrine, Manue, Laurent, Claudine, Laurine, Bruno. Yannick, Marion, merci pour votre attention, dépannage et entretien du cytomètre, matériel indispensable à la réalisation de mes travaux. Anne-Caire et Aurélie, merci pour votre accueil au sein du CERMN et votre expertise sur les NP.

Chloé, ma plus belle rencontre à l'internat ☺ ! Merci pour tous ces moments passés ensemble, que ce soit autour d'une bière à refaire le monde, faire les magasins (parce

qu'il nous manque toujours un truc !) ou juste se changer les idées parce que « on en parle pas ».

A vous 2 qui n'avez pas la capacité de lire ces lignes mais que je ne peux pas ne pas remercier. Toutes ces années d'études ne se seraient pas déroulées de la même façon si vous n'aviez pas été là. Ma « fille » pour me montrer que je suis la seule qui compte malgré que je ne te voie pas aussi souvent que je le voudrais, et mon « cretinus » pour ta joie de vivre. Chacune à votre manière vous avez la capacité de me rendre folle de rage comme de me rendre la plus heureuse ! Mais surtout le pouvoir de me faire oublier tout le reste l'espace d'un instant. Comme le dit si bien le proverbe, l'air du paradis est celui qui souffle entre les oreilles d'un cheval.

Laurent, merci d'avoir été et d'être là dans les bons comme les mauvais moments de cette thèse. Ton soutien m'a été précieux dans les moments de mou et de doutes durant ces derniers mois. Tu m'as attendu pendant ces longues soirées de manips, dégagé du temps pour la rédaction, essayé de me rassurer, alors merci pour tout ça et pour tout le reste.

Un grand merci à mes parents. Vous nous avez toujours soutenu, fait en sorte que nos études se passent dans les meilleures conditions possibles, donné le meilleur pour que nous puissions atteindre nos objectifs. Merci papa pour m'avoir soulagé des soins à apporter à la jument et merci maman pour ces repas à rapporter chez moi (souvent bien trop copieux) afin que je n'aie pas ça à penser. Mathieu, je suis presque sûre que tu ne sais pas en quoi je suis exactement, entre la pharma et le reste tu me diras que tu t'y perds, ça m'a toujours fait rire. Ta façon de percevoir la simplicité de la vie fait plaisir à voir, ne change rien même si tes aventures peuvent parfois nous angoisser un peu. Mais au fond ça ne sert à rien de stresser !



## Table des matières

<b>Table des matières</b> .....	<b>1</b>
<b>Index des figures</b> .....	<b>5</b>
<b>Liste des abréviations</b> .....	<b>9</b>
<b>I. INTRODUCTION</b> .....	<b>13</b>
1. Les mécanismes de la réponse immunitaire .....	15
a. Introduction / généralités .....	15
b. Les acteurs de l'immunité adaptative .....	16
Les organes lymphoïdes .....	17
Les lymphocytes B .....	18
Les lymphocytes T .....	22
Les cellules présentatrices d'antigène .....	24
Les lymphocytes mémoires .....	25
c. Mécanismes de la réponse immunitaire adaptative .....	26
L'activation des lymphocytes T .....	26
d. La tolérance immunitaire .....	29
La tolérance centrale .....	30
La tolérance périphérique .....	31
e. La réponse immunitaire adaptative dans le SNC .....	34
Voie d'entrée méningée .....	35
Voie d'entrée par la barrière hémato-encéphalique .....	36
Voie d'entrée par les plexus choroïdes .....	37
2. Le récepteur au N-Méthyl-D-Aspartate .....	39
a. Le récepteur NMDA .....	39
Structure .....	39
Fonction .....	41
b. Distribution du NMDAR dans l'organisme .....	42

Localisation du NMDAR .....	42
Récepteurs à l'ephrinB et au NMDA .....	44
c. Pathologies impliquant le NMDAR .....	45
3. L'encéphalite autoimmune à auto anticorps anti-récepteur au N-Methyl-D-Aspartate	47
a. Pathologies autoimmunes.....	47
Maladies non spécifiques d'organes .....	47
Maladies spécifiques d'organes .....	48
b. Epidémiologie .....	48
Les encéphalites.....	48
Les encéphalites autoimmunes à auto-Ac anti-NMDAR.....	49
Etiologie.....	50
Les encéphalites autoimmunes à auto anticorps anti-NMDAR : cas pédiatriques .....	51
c. Les Ac anti-NMDAR.....	52
d. Effets des Ac anti-NMDAR.....	54
Diminution de l'activité des NMDAR.....	54
Internalisation des NMDAR.....	56
e. Manifestations cliniques.....	58
Tableau clinique et évolution.....	58
Population pédiatrique .....	61
f. Diagnostic .....	61
Examen .....	61
Examens complémentaires.....	62
Anomalies du LCR.....	63
Recherche des Ac anti-NMDAR.....	64
g. Prise en charge .....	66
4. Les modèles murins d'encéphalite autoimmune à anticorps anti-NMDAR.....	69
a. Les modèles par immunisation active .....	69

Modèle de Wagnon et collaborateurs.....	69
Modèle de Pan et collaborateurs .....	73
Modèle de Ding et collaborateurs.....	74
Modèle de Jones et collaborateurs .....	77
b. Les modèles de transfert passif d'anticorps .....	81
Modèle de Planagumà et collaborateurs .....	81
Modèle de Malviya et collaborateurs.....	83
Modèle de Wright et collaborateurs.....	85
5. Les nanoparticules dans les stratégies d'immunothérapie tolérogène.....	88
a. Les immunothérapies tolérogènes .....	89
b. Les nanoparticules.....	90
Historique .....	90
Définition.....	91
Caractéristiques.....	92
c. Applications des nanoparticules dans le domaine biomédical .....	94
d. Les nanoparticules et stratégie d'immunothérapie tolérogène .....	95
Les nanoparticules dans le modèle d'EAE .....	97
Les nanoparticules dans un modèle de diabète de type 1.....	99
Les nanoparticules dans un modèle d'inflammation respiratoire allergique .....	101
Les nanoparticules dans un modèle de maladie cœliaque.....	102
<b>II. OBJECTIFS .....</b>	<b>107</b>
<b>III. RESULTATS .....</b>	<b>111</b>
<b>IV. DISCUSSION .....</b>	<b>161</b>
1. La réponse lymphocytaire dans le modèle EA à Ac anti-NMDAR .....	163
2. Induction d'une immunothérapie tolérogène dans le modèle EA à Ac anti-NMDAR .....	174
<b>V. CONCLUSION .....</b>	<b>179</b>
<b>AUTRES TRAVAUX .....</b>	<b>183</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>253</b>



## Index des figures

Figure 1 : Mise en place des mécanismes de l'immunité lors d'une réaction immunitaire. ....	16
Figure 2 : Production et maturation des lymphocytes au sein des organes lymphoïdes.....	18
Figure 3 : Structure du BCR. ....	19
Figure 4 : Mécanisme de commutation isotypique des chaînes lourdes.....	21
Figure 5 : Structure du TCR. ....	23
Figure 6 : Mécanisme d'activation des lymphocytes T.....	27
Figure 7 : Différenciation des lymphocytes T après leur activation. ....	29
Figure 8 : Mécanismes de tolérance périphérique des lymphocytes T.....	32
Figure 9 : Voies d'entrée des cellules immunitaires dans le SNC. ....	35
Figure 10 : Représentation d'une sous-unité du NMDAR. ....	41
Figure 11 : Répartition des sous-unités du NMDAR selon le stade de développement.....	43
Figure 12 : Répartition des encéphalites selon leur origine.....	49
Figure 13 : Localisation des NMDAR au niveau du SNC. ....	52
Figure 14 : Identification de la sous-unité impliquée dans la liaison de l'Ac au NMDAR.....	54
Figure 15 : Effet des Ac de patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR sur l'hippocampe de souris. .....	56
Figure 16 : Illustration du mécanisme d'internalisation des NMDAR dans l'EA à Ac anti-NMDAR.....	57
Figure 17 : Evolution d'une EA à Ac anti-NMDAR. ....	60
Figure 18 : Tableau d'aide au diagnostic positif d'une EA à Ac anti-NMDAR.....	62
Figure 19 : Coupe histologique de cerveau de rat en présence de LCR de patient atteint d'une EA à Ac anti-NMDAR. ....	65
Figure 20 : Co-marquages de cellules HEK transfectées exprimant le NMDAR en présence de LCR de patient. ....	66
Figure 21 : Production d'Ig spécifiques de GluN1 dans un modèle d'EA à Ac anti-NMDAR..	70
Figure 22 : Infiltration de lymphocytes B dans le SNC dans le modèle d'EA à Ac anti-NMDAR. .....	71



Figure 23 : L'immunisation avec le peptide GluN1 induit un comportement anxieux et dépressif, associé à un trouble de mémorisation. ....	72
Figure 24 : Effets biologiques et comportementaux des IgG anti-NMDAR d'un modèle murin présentant une altération de la BHE. ....	74
Figure 25 : Effet des Ac issus de LCR de patients ou de souris immunisées sur la densité d'expression des NMDAR. ....	75
Figure 26 : Phénotype comportemental dans un modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR. ....	76
Figure 27 : Détection d'IgG anti-NMDAR dans un modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR. ....	78
Figure 28 : Infiltration de cellules immunitaires dans le SNC dans un modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR. ....	79
Figure 29 : Phénotype comportemental d'un modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR. ....	80
Figure 30 : Quantification des Ac anti-NMDAR dans l'hippocampe des animaux immunisés par transfert passif de LCR de patient. ....	82
Figure 31 : Effet sur le comportement murin de l'injection de LCR de patients contenant des Ac anti-NMDAR. ....	83
Figure 32 : Densité des NMDAR dans l'hippocampe de souris injectées avec un Ac monoclonal anti-NMDAR. ....	84
Figure 33 : Effet de l'Ac monoclonal humain anti-NMDAR sur la mémorisation des souris. ..	85
Figure 34 : Effet de l'injection d'IgG de patients sur les crises d'épilepsies chez les souris. .	86
Figure 35 : Echelle de la représentation de la taille des nanomatériaux. ....	91
Figure 36 : Classification des différents types de NP. ....	92
Figure 37 : Formulation de NP PLGA. ....	97
Figure 38 : Effet de l'injection de NP dans un modèle EAE. ....	98
Figure 39 : Sécrétion de cytokines dans la rate des souris EAE préalablement injectées avec des NP couplées au peptide. ....	99
Figure 40 : Effet de l'injection de NP associées au peptide p31 dans un modèle murin de DT1. ....	100
Figure 41 : Mesure des cytokines provenant du surnageant du BALF dans un modèle allergique d'inflammation des voies respiratoires. ....	102
Figure 42 : Effet de l'injection de NP PLGA contenant la protéine gliadine dans un modèle de maladie cœliaque. ....	103

Figure 43 : Hypothèses du rôle des lymphocytes B et T dans les modèles de l'EAE et de l'EA à Ac anti-NMDAR. ....	168
Figure 44 : Production d'IFN- $\gamma$ par les cellules extraites des méninges des souris EA à Ac anti-NMDAR. ....	169



## Liste des abréviations

ABD (Domaine de liaison à l'Ac)

Ac (Anticorps)

Ag (Antigène)

AIRE (Autoimmune regulator)

AVC (Accident vasculaire cérébral)

BALF (Bronchoalveolar lavage fluid ou liquid de lavage bronchoalvéolaire)

BCR (B cell receptor)

BCSFB (Blood cerebrospinal fluide barrier ou barrière sang-liquide cérébrospinal)

BHE (Barrière hématoencéphalique)

C (Constant-e)

Ca<sup>2+</sup> (Calcium)

CD (Cluster de différenciation)

CFA (Adjuvant complet de Freund)

CMH (Complexe majeur d'histocompatibilité)

CPA (Cellule présentatrice d'antigène)

CTD (Domaine cytosolique)

DN (Doubles négatifs)

DT1 (Diabète de type 1)

EA (Encéphalite autoimmune)

EAE (Encéphalomyélite autoimmune expérimentale)

EEG (Electroencéphalogramme)

EphB2 (Ephrine B2)

HEK (Human Embryonic Kidney)

HSV (Herpes simplex virus)

i.p. (Intra-péritonéale)

i.v. (Intra-veineux)  
ICAM (Intercellular adhesion molecule)  
IFN (Interféron)  
Ig (Immunoglobuline)  
IL (Interleukine)  
IRM (Imagerie à résonance magnétique)  
LCR (Liquide céphalorachidien)  
MBP (Protéine basique de la myéline)  
MDSC (Cellules suppressives dérivées des myéloïdes)  
MOG (Myelin oligodendrocyte glycoprotein)  
NK-T (T natural killer)  
nm (Nanomètre)  
NMDA (N-Méthyl-D-Aspartate)  
NMDAR (N-Méthyl-D-Aspartate récepteur)  
NMO (Neuromyéélite optique)  
NP (Nanoparticules)  
NTD ou ATD (Domaine aminoterminal)  
OL (Organes lymphoïdes)  
PEMA (Poly(ethylene-*alt*-maleic anhydride))  
PLGA (Poly(lactic-co-glycolic acid))  
PLP (Proteolipid protein)  
PNN (Polynucléaires neutrophiles)  
PTZ (Pentylentetrazol)  
s.c. (Sous-cutanée)  
SEP (Sclérose en plaques)  
SNC (Système nerveux central)

TCR (T cell receptor)

Tfh (Lymphocyte T folliculaire helper)

TGF- $\beta$  (Transforming growth factor  $\beta$ )

Th (Lymphocyte T helper)

TMD (Domaine transmembranaire)

V (Variable)

VCAM (Vascular cell adhesion molecule)

VDJ (Variable, diversité, junction)



# I. INTRODUCTION





## Introduction

### 1. Les mécanismes de la réponse immunitaire

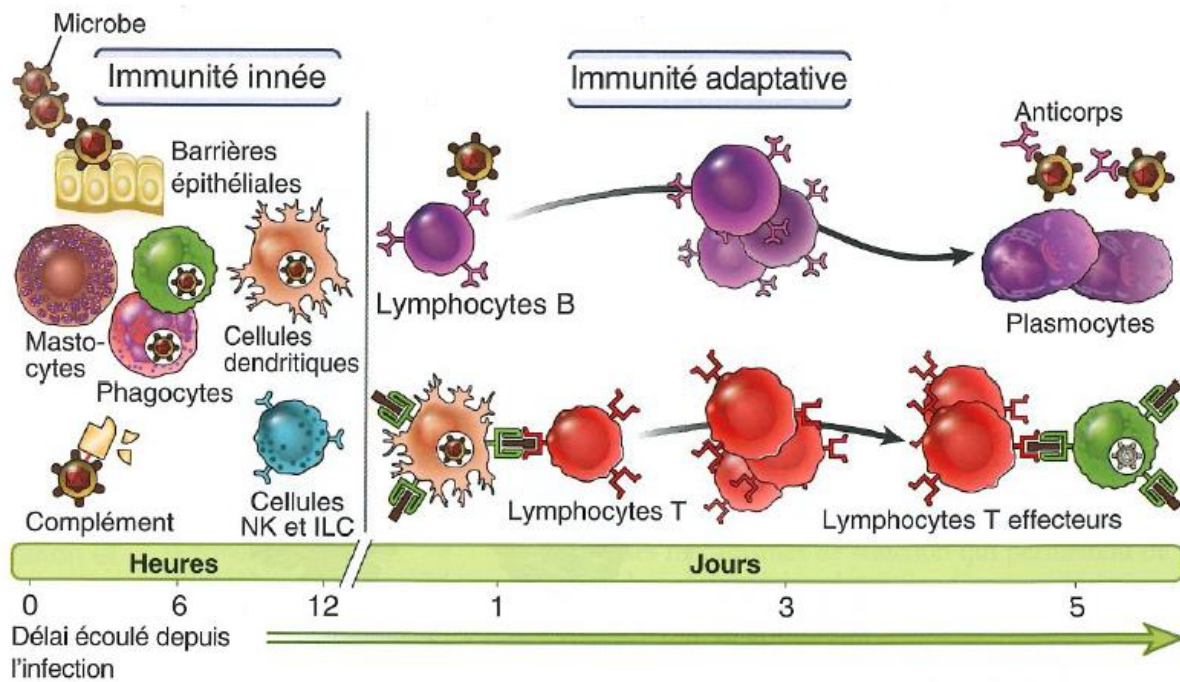
#### a. Introduction / généralités

Le concept de l'immunité est défini comme l'ensemble des outils de défense d'un organisme contre les éléments étrangers à cet organisme, et en particulier les agents infectieux. Afin d'assurer la défense de l'organisme, le système immunitaire doit être capable de distinguer ce qui est du « non soi » de ce qui est du « soi ». Une mauvaise distinction peut conduire au développement d'une maladie dite auto-immune, c'est-à-dire que le propre système immunitaire de l'organisme se retourne contre le « soi ». Notre sujet d'étude, l'encéphalite auto-immune (EA) à anticorps (Ac) anti-récepteur au N-Méthyl-D-Aspartate (NMDAR), fait partie de ce type de pathologies.

Au sein du système immunitaire il est identifié deux types de réponse immunitaire : la réponse innée et la réponse adaptative. L'immunité innée est présente chez chaque individu dès la naissance. Elle est notamment caractérisée par les barrières physiques, telles que la peau ou les muqueuses, et des cellules, telles que les macrophages ou les polynucléaires, mais également les molécules solubles telles que les molécules du complément. L'immunité innée est la première ligne de défense de l'organisme. Aussi, elle s'active très rapidement, dans les premières minutes suite à une infection. Afin de répondre au mieux et dans les meilleurs délais à une infection, les acteurs de cette immunité sont ubiquitaires, c'est-à-dire qu'ils sont représentés dans tous les tissus. Cette réponse immunitaire innée est associée au second type de réponse décrit : l'immunité adaptative. L'immunité adaptative est identifiable plus tard dans le processus, en général dans les jours suivant l'infection. Elle perdurera plus longtemps et fait intervenir les lymphocytes. Au sein de l'immunité adaptative, il est distingué

l'immunité humorale mettant en jeu les lymphocytes B et l'immunité cellulaire mettant en jeu les lymphocytes T (Abbas et al. 2016) (Figure 1).

Dans les prochains paragraphes nous développerons les acteurs et mécanismes mis en jeu lors d'une réponse immunitaire adaptative.



**Figure 1 : Mise en place des mécanismes de l'immunité lors d'une réaction immunitaire.**

La réponse immunitaire innée, *via* par exemple les mastocytes ou les cellules dendritiques, s'active dès les débuts suivant l'infection. La réponse immunitaire adaptative, *via* les lymphocytes, est identifiable les jours suivants et met en avant des acteurs spécifiques du pathogène qui pourront perdurer au cours du temps et qui permettront une réponse rapide si le pathogène se présente de nouveau (Abbas et al. 2016).

### b. Les acteurs de l'immunité adaptative

L'immunité adaptative interviendra après l'immunité innée et met en jeu différents acteurs. A la différence de l'immunité innée, dont les mécanismes se déroulent globalement de la même façon quel que soit le pathogène, permettant ainsi une

réponse précoce, ceux de l'immunité adaptative seront recrutés de manière spécifique au pathogène.

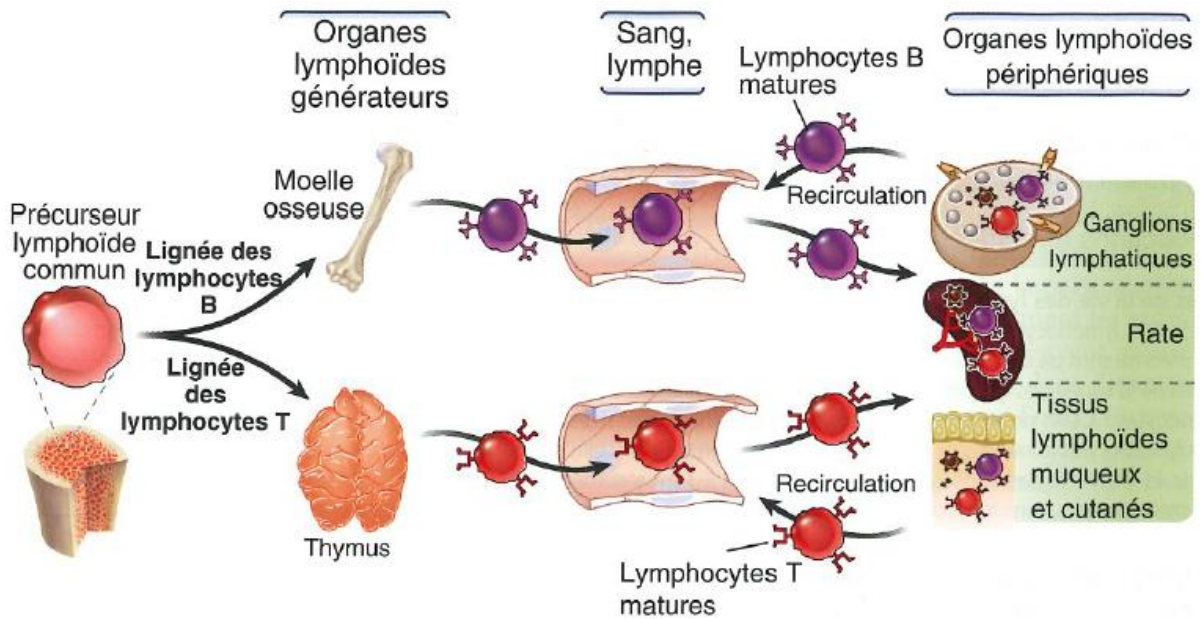
Les lymphocytes sont porteurs d'un récepteur qui va reconnaître un antigène (Ag). Ces Ag sont reconnus de façon spécifique par les récepteurs T ou B. La reconnaissance, *via* différents mécanismes, permet une spécificité de la réponse immunitaire qui perdurera dans le temps mais également une rapidité d'action en cas de réinfection.

Ces cellules ont pu être caractérisées par les molécules qu'elles expriment en surface et qui ont été répertoriées sous la dénomination cluster de différenciation (CD). Ils permettent d'identifier les lymphocytes T et B par exemple et de les reconnaître selon leur stade de maturation et/ou d'activation.

### Les organes lymphoïdes

Les organes lymphoïdes (OL) sont distingués en deux groupes, les OL primaires et les OL secondaires (**Figure 2**). Dans les OL primaires (ou centraux) sont retrouvées les cellules souches progénitrices des lymphocytes T et B et sont le lieu de la différenciation de ces lymphocytes. La moelle osseuse et le thymus constituent ce premier groupe d'OL.

Suite à leur maturation, les cellules immunitaires vont ensuite migrer à travers la circulation sanguine et lymphatique jusque dans les OL dits secondaires (ou périphériques) où elles pourront rencontrer les Ag. La rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT, Mucosa-Associated Lymphoreticular Tissue) constituent les OL secondaires.



**Figure 2 : Production et maturation des lymphocytes au sein des organes lymphoïdes.**

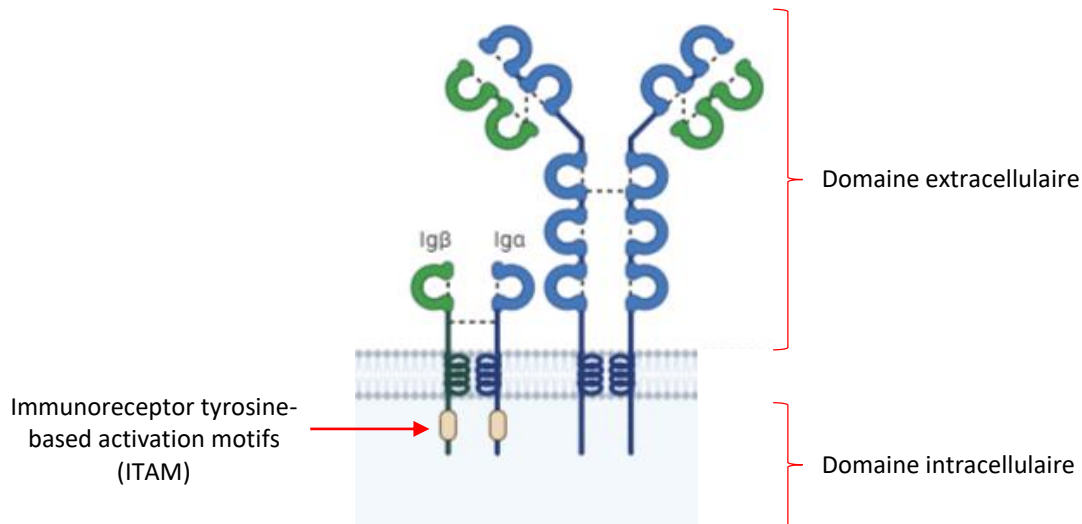
Les lymphocytes B et T sont issus des organes lymphoïdes primaires (générateurs) que sont la moelle osseuse et le thymus. *Via* la circulation ils gagnent les organes lymphoïdes secondaires (périphériques), ganglions lymphatiques, rate et tissus lymphoïdes où ils peuvent rencontrer les Ag (Abbas et al. 2016).

### Les lymphocytes B

Les précurseurs des lymphocytes B proviennent de la moelle osseuse (comme ceux des lymphocytes T) et ils y réalisent toute leur différenciation. Une fois matures, ils vont rejoindre la circulation sanguine puis les OL secondaires. Les lymphocytes B, une fois activés, se différencient en plasmocytes qui produiront les Ac.

Les lymphocytes B portent un récepteur spécifique de l'antigène, le B cell receptor (BCR) (**Figure 3**). Celui-ci est un Ac, ancré à la membrane de la cellule, comprenant un domaine variable (V) et un domaine constant (C), de nature

immunoglobuline M (IgM) à l'état naïf (Abbas et al. 2016). A ce BCR sont associées deux protéines, Ig $\alpha$  et Ig $\beta$ . Les BCR reconnaissent les Ag.



**Figure 3 : Structure du BCR.**

Le BCR des lymphocytes B est composé d'un Ac IgM, associé aux protéines Ig $\alpha$  et Ig $\beta$ . Ces protéines contiennent au niveau cytosolique un motif ITAM à tyrosine kinase permettant la transmission du signal. ITAM, immunoreceptor tyrosine-based activation motifs.

Pendant le développement des Ig, les régions variables V font l'objet de recombinaisons sur les exons de l'ADN qui codent pour cette région, appelés segments VDJ (variable, diversité, jonction) (Hozumi et Tonegawa 2004). Ces recombinaisons se déroulent de manière aléatoire et permettant la reconnaissance d'un nombre très important de l'ordre de  $10^{13}$  Ag différents (Pieper, Grimbacher, et Eibel 2013).

Une mutation sur les gènes *RAG1* et *RAG2*, impliqués dans les mécanismes de la recombinaison VDJ, entraîne une carence de celle-ci conduisant à l'absence de

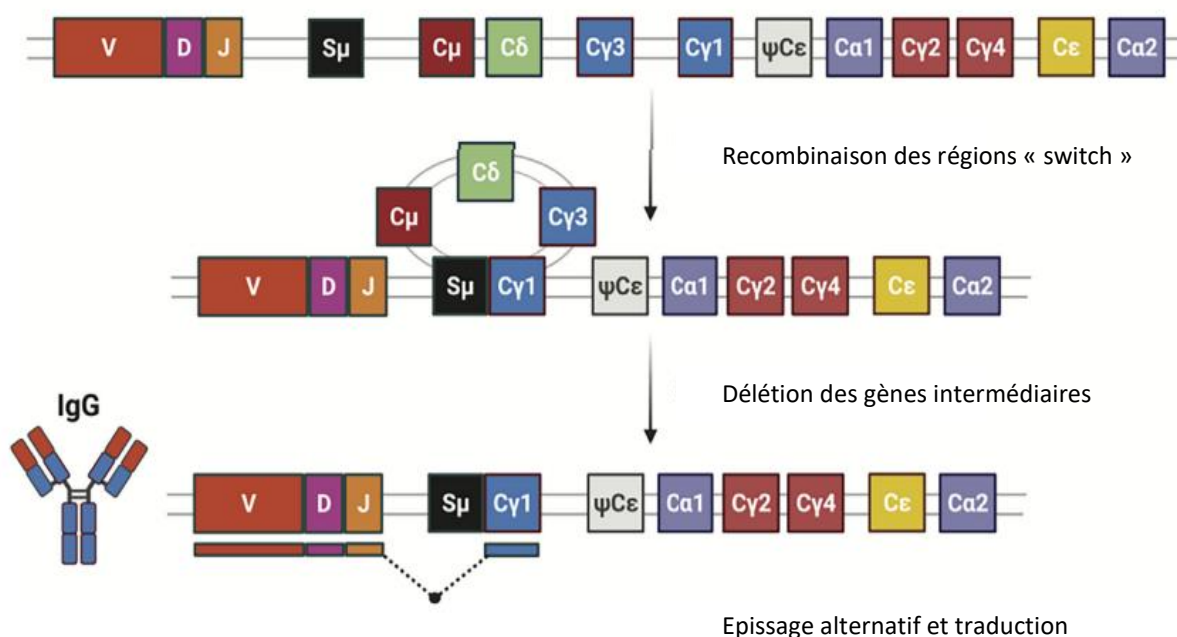
lymphocytes B et T et par conséquent de la production d'Ig (Shinkai *et al.* 1992; Mombaerts *et al.* 1992). Ceci est à l'origine d'un déficit immunitaire combiné sévère (SCID) (de Villartay, Fischer, et Durandy 2003).

La réponse immunitaire B peut varier selon qu'elle est T-dépendante ou T indépendante. Dans le cas de la réponse T-indépendante, les Ag (Ag non protéiques et lipidiques) induisent la production d'Ac mais sans évolution quantitative ou qualitative. Les Ig produites seront quasi exclusivement des IgM et resteront de faible affinité pour l'Ag. Ces lymphocytes sont identifiés comme étant les lymphocytes B de la zone marginale. Dans le cadre de la réponse T-dépendante, les lymphocytes B présentent l'Ag aux lymphocytes T préalablement activés et recevront des informations nécessaires à leur différenciation finale. Ces lymphocytes sont dits lymphocytes B folliculaires. Les phénomènes de commutation isotypique et de maturation d'affinité sont observés pour ces lymphocytes, générant des plasmocytes à longue durée de vie et des Ac de haute affinité.

Suite à une stimulation par l'Ag du lymphocyte B et par les interactions avec les lymphocytes T, il est observé une commutation isotypique (ou de classe) (**Figure 4**). Ce phénomène implique un changement de la chaîne lourde de l'Ig, initialement IgM, se déroulant au niveau des exons codant pour la partie constante C de l'Ig (déterminant le type d'Ig, C $\mu$  pour une IgM par exemple). Lors de la production d'IgM, dans la chaîne lourde, l'exon VDJ se trouve juste en amont de la région C $\mu$ . En aval de cette région C $\mu$  se trouve d'autres régions C codant pour les régions constantes des autres types d'Ig (par exemple la région C $\gamma$  code pour une IgG). Au sein d'un intron de ces régions C se trouve une séquence appelée « switch » qui est capable de recombiner avec la séquence « switch » d'une autre région C, entraînant l'élimination



de l'ensemble de l'ADN se situant entre ces deux séquences. Le segment VDJ se trouvant initialement près de  $C\mu$  se trouve alors près de la région C codant pour un autre type d'Ig. Le brin d'ADN ainsi formé est transcrit en ARNm puis traduit en protéine conduisant à la production d'autres Ig que des IgM. Ainsi, les Ig issues de la commutation isotypique peuvent être des IgG, des IgE, ou des IgA impliquées selon l'isotype dans les réponses impliquant le complément, l'opsonisation ou encore l'immunité néonatale, dans l'immunité contre les helminthes et dans l'immunité des muqueuses respectivement (Senger *et al.* 2015).



**Figure 4 : Mécanisme de commutation isotypique des chaînes lourdes.**

La chaîne lourde du lymphocyte B activé producteur d'IgM est constituée des segments VDJ réarrangés suivis des gènes codant les régions constantes C. Les interactions avec les lymphocytes T induisent une recombinaison des régions « switch » se trouvant en amont de chaque gène des régions C. La séquence ADN se trouvant entre deux régions « switch » est éliminée pour placer le gène de la nouvelle classe d'Ig à la suite des segments VDJ. La traduction en ARNm et l'épissage alternatif précèdent la traduction et la synthèse des Ig. Adapté de (Gullickson *et al.* 2022).



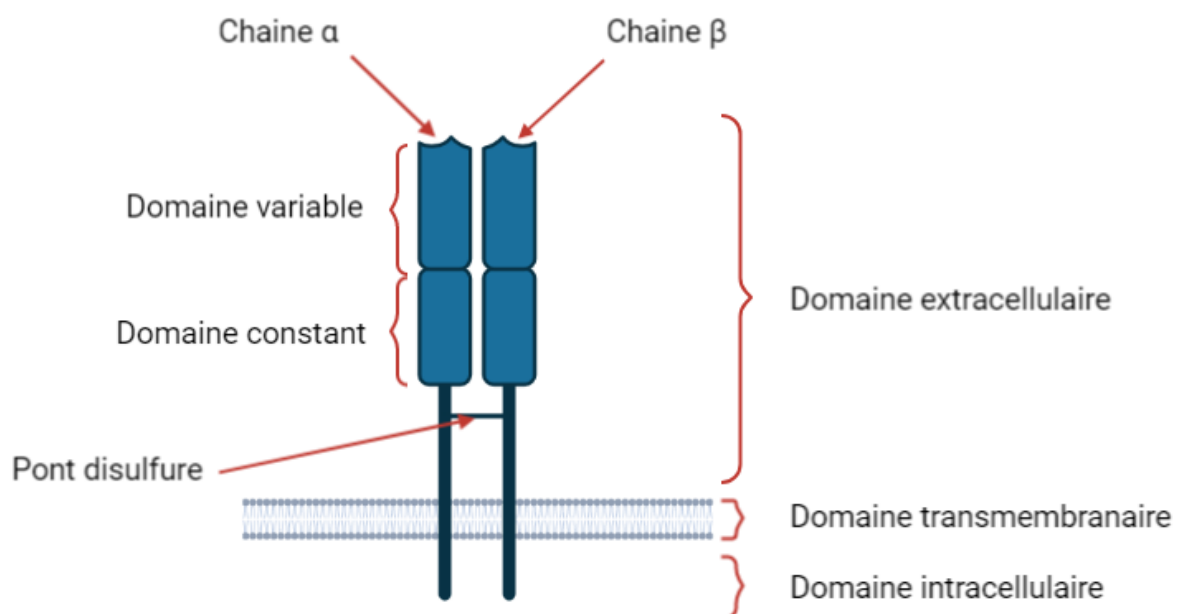
La forte affinité des Ig pour l'Ag est liée au phénomène de maturation d'affinité, ou hypermutation somatique, des lymphocytes B qui se réalise dans les centres germinatifs, lieu où les lymphocytes B folliculaires prolifèrent et subissent des divisions rapides. En effet, pendant que l'infection est présente, la stimulation des lymphocytes B par l'Ag est répétée et continue. Dans le cas des réponses T-dépendantes, on assiste alors à des mutations ponctuelles dans les gènes des régions V. Divers clones sont ainsi formés et les Ig produites ont donc une affinité variable pour l'Ag. Les lymphocytes B, différenciés en plasmocytes qui produisent les Ac ayant une forte affinité pour l'Ag, le lient plus efficacement, ce qui leur permet de survivre et donc de continuer à produire des Ac.

Des mutations peuvent être à l'origine d'un défaut du processus de commutation isotypique. Par exemple, une mutation du CD40 ou CD40L, exprimés par les lymphocytes B et T respectivement, compromet les interactions entre ces deux entités. Le changement de classe d'Ig n'a pas lieu et une augmentation d'IgM est observée, associée à une faible quantité ou absence d'IgG, d'IgA et d'IgE. Cette pathologie est une cause du syndrome d'hyper IgM liée à l'X (le plus répandu étant le type I pour la mutation du CD40L) et ne permet pas une réponse efficace contre le pathogène (Jain *et al.* 1999; de Villartay, Fischer, et Durandy 2003; Korthäuer *et al.* 1993).

### Les lymphocytes T

Les précurseurs immatures des lymphocytes T, provenant de la moelle osseuse, vont migrer dans le thymus afin d'y terminer leur maturation. Les lymphocytes T matures rejoindront la circulation sanguine puis les OL secondaires, tels que la rate et les ganglions lymphatiques. La reconnaissance de l'Ag par le

lymphocyte T se fait *via* son TCR (T cell receptor) (**Figure 5**). Le TCR est associé à la molécule CD3, spécifique des lymphocytes T, qui permet la signalisation intracellulaire. Aux côtés de ce TCR il est retrouvé les molécules CD4 ou CD8 qui reconnaissent respectivement les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II ou de classe I. Le TCR est constitué de deux chaînes polypeptidiques  $\alpha$  et  $\beta$  ou  $\gamma$  et  $\delta$  reliées par un pont disulfure. Le TCR le plus répandu est le TCR  $\alpha\beta$  à hauteur de 87% contre 13% pour le TCR  $\gamma\delta$  (Scott, Richards, et Roberts 1990). Chaque chaîne possède au niveau extracellulaire un domaine C et un domaine V. Les combinaisons diverses des domaines  $V\alpha$  et  $V\beta$  du TCR permettent de reconnaître des Ag extrêmement variés.



**Figure 5 : Structure du TCR.**

Le TCR des lymphocytes T est composé de deux chaînes  $\alpha\beta$  ou  $\gamma\delta$ , reliées entre elles par un pont disulfure, et qui comportent trois domaines que sont les domaines extracellulaire, transmembranaire et intracellulaire. Le domaine extracellulaire de chaque chaîne comprend un domaine C et un domaine V, impliqué dans la reconnaissance de l'Ag. Le TCR le plus commun est le TCR $\alpha\beta$ .

Parmi les lymphocytes T, il est identifié plusieurs populations fonctionnelles. Ainsi, les lymphocytes T auxiliaires, identifiés par le CD4, ont des fonctions différentes selon les cytokines qu'ils produisent. Ces profils sont déterminés selon les cytokines présentes dans le milieu au moment de la différenciation. Les lymphocytes T dits cytotoxiques, identifiés par le CD8, détruisent les cellules infectées et les lymphocytes T régulateurs (principalement CD4), permettent de contrôler et d'atténuer la réponse immunitaire.

Les lymphocytes T, qu'ils soient CD4 ou CD8, n'ont pas la capacité de reconnaître un Ag sous forme libre ou soluble. Celui-ci doit leur être présenté à la surface d'une cellule associé au CMH, il est dit que les lymphocytes T sont restreints par le CMH. C'est le rôle des cellules présentatrices d'antigène (CPA) que de réaliser cet apprêtement de l'Ag pour les lymphocytes T qui ne sont pas infectés.

### Les cellules présentatrices d'antigène

Les CPA sont des cellules du système immunitaire inné capables de capter les Ag et de les présenter aux lymphocytes. Les plus efficaces sont les cellules dendritiques mais les macrophages, les lymphocytes B et d'autres types cellulaires tels que les kératinocytes exercent aussi les fonctions de CPA (Ardavin et Shortman 1992; Takagi et al. 2006).

Les CPA portent à leur surface des molécules du CMH permettant la présentation de l'Ag aux lymphocytes T. Il existe deux types de molécules du CMH : celles de classe II qui présentent aux lymphocytes T CD4, et celles de classe I qui présentent aux lymphocytes T CD8.

Avant de pouvoir être reconnu par un lymphocyte T et selon sa provenance, la protéine antigénique doit être apprêtée. Lorsqu'il s'agit d'une protéine extracellulaire celle-ci est internalisée dans la CPA puis dégradée en peptides au sein de vésicules telles que les lysosomes. Ces peptides sont ensuite associés à une molécule du CMH de classe II. Le complexe ainsi formé est transporté jusqu'à la surface de la cellule et pourra être reconnu par un lymphocyte T CD4. Lorsqu'il s'agit d'une protéine cytosolique, issue d'une synthèse endogène du pathogène infectant une cellule, celle-ci est dégradée au sein d'un protéasome en peptide qui est ensuite associé à une molécule du CMH de classe I au niveau du réticulum endoplasmique. S'en suit une migration de ce complexe peptide-CMH I, à la membrane pour être reconnu par un lymphocyte T CD8. Un autre type de présentation peut avoir lieu, il s'agit de la présentation croisée. L'Ag issu d'une cellule infectée, de débris cellulaires ou autre, peut être internalisé par une CPA. Un complexe peptide-CMH I est alors formé et est exporté à la membrane. Ce type de présentation permet l'activation et la prolifération de lymphocytes T CD8 qui pourront ensuite tuer les cellules infectées.

### Les lymphocytes mémoires

Après stimulation antigénique des lymphocytes différenciés vont perdurer et constituer une réserve de cellules, dites cellules mémoires. Les cellules mémoires ont une longue durée de vie et restent présentes dans l'organisme même une fois l'infection terminée. Lors d'une réinfection, ces cellules ont la capacité de réagir très rapidement et la réponse immunitaire sera alors plus rapide que lors de la primo-infection. Aussi, la proportion de cellules mémoires augmente avec l'âge. Par exemple, pour les lymphocytes B mémoires, leur proportion est plus faible dans la population pédiatrique et est au maximum à l'âge adulte, pour ensuite diminuer légèrement après

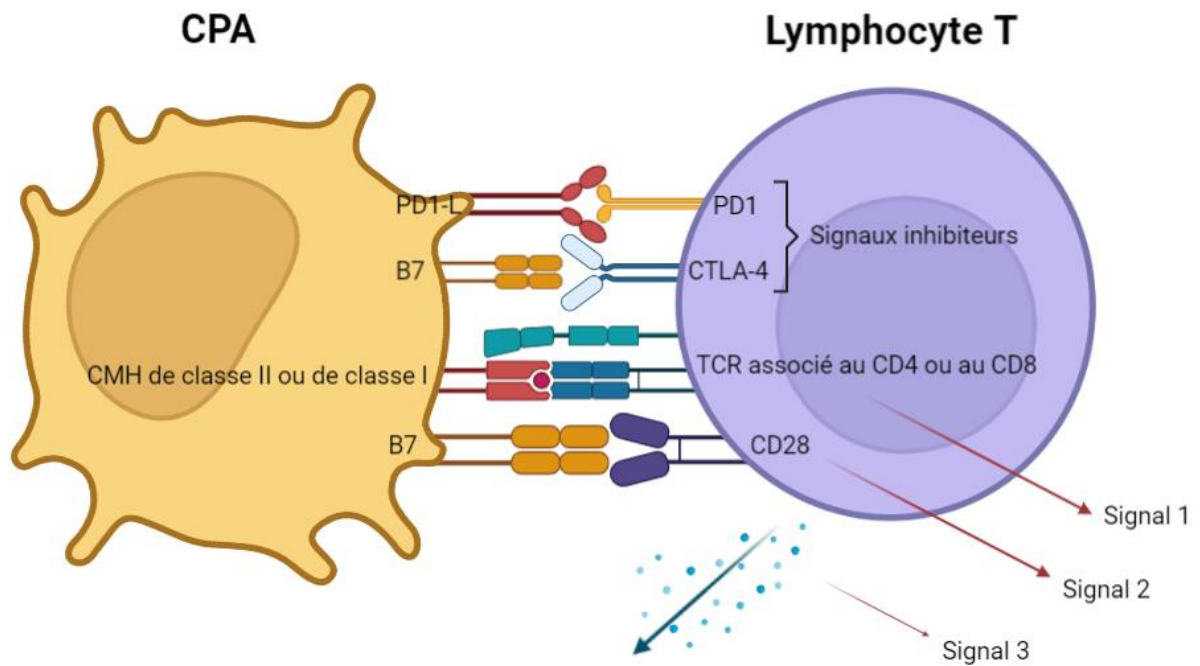
65 ans (Ciocca et al. 2021). Cette analyse peut être sous-estimée car effectuée seulement dans le sang périphérique alors que les lymphocytes B mémoires ont été identifiés dans les poumons, mais pourraient également être présent dans d'autres organes tels que les intestins ou la peau (C. M. Lee et Oh 2022). Concernant les lymphocytes T mémoires, ils résident à la fois dans les OL, où ils sont définis comme cellules mémoires centrales, et dans les tissus non lymphoïdes, où ils sont définis comme cellules mémoires effectrices (Sallusto et al. 1999). Ainsi, dans la peau, les cellules T résidentes présentent en majorité un phénotype mémoire T helper (Th) 1 mais également Th2 et T régulatrices (Clark et al. 2006).

### c. Mécanismes de la réponse immunitaire adaptative

A la suite d'une infection la réponse immunitaire adaptative va se mettre en place suivant plusieurs étapes et sous l'effet de différents facteurs que nous détaillerons dans cette partie.

#### L'activation des lymphocytes T

Les lymphocytes T reconnaissent l'Ag qui leur est présenté par les CPA associé aux molécules du CMH. Cette reconnaissance mènera à l'activation du lymphocyte, à condition que celui-ci reçoive l'ensemble des signaux nécessaires (**Figure 6**).



**Figure 6 : Mécanisme d'activation des lymphocytes T.**

Le premier signal d'activation est généré par la reconnaissance de l'Ag par le TCR. Un second signal est nécessaire pour l'activation complète du lymphocyte T. Il est assuré par les molécules de co-stimulation CD28 et B7. Un signal complémentaire correspond à la production de cytokines par le lymphocyte T CD4. Des signaux inhibiteurs sont également retrouvés, permettant de mettre fin à la réponse immunitaire. Ces signaux sont assurés par les molécules PD1 et CTLA-4 et leurs ligands PD1-L et B7. TCR, T cell receptor ; CMH, complexe majeur d'histocompatibilité.

Le premier signal correspond à la reconnaissance de l'Ag par le TCR. Ce premier signal, à lui seul, n'est pas suffisant pour induire l'activation du lymphocyte T naïf.

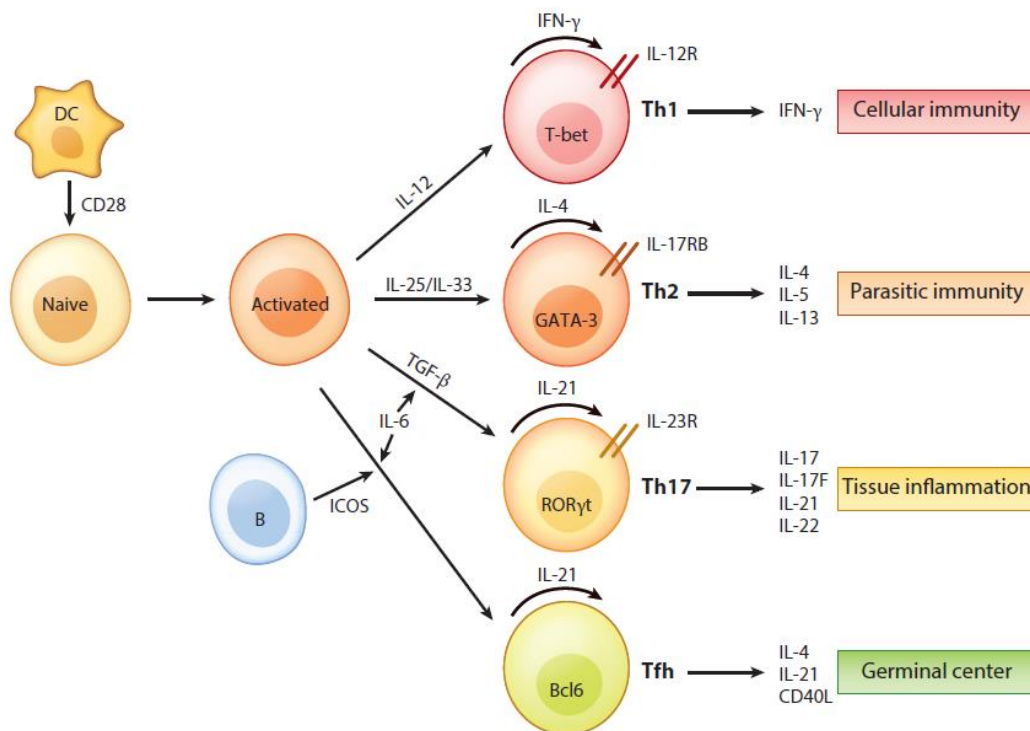
Le second signal est apporté par les molécules de co-stimulation présentes sur les lymphocytes T et les CPA. Ainsi, parmi les molécules de co-stimulation, la plus importante est la molécule CD28 du lymphocyte T naïf, qui se lie avec la molécule B7 portée par la CPA. Suite à ces interactions le lymphocyte T est activé. Ces molécules B7 peuvent également interagir plus tardivement avec des récepteurs inhibiteurs de l'activation, tels que CTLA-4, qui participent à mettre fin à la réponse immunitaire.

Un signal complémentaire, troisième signal, fait suite à l'activation des lymphocytes T et correspond à la production de cytokines. Le pathogène impliqué et la composition de l'environnement conduisent la différenciation du lymphocyte et donc la nature des cytokines produites. Les cytokines régulent la réponse immunitaire en cours (Dong 2021) et orientent la différenciation, *via* les facteurs de transcription. Une fois que les lymphocytes sont différenciés ils produiront un ensemble de cytokines qui leur est propres (Dong 2021) (**Figure 7**). Ainsi, les lymphocytes Th1 produiront de l'interféron  $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) qui sera impliqué dans les réponses cellulaires notamment par activation des lymphocytes T CD8. Les lymphocytes Th2 produisent de l'interleukine 4 (IL-4), de l'IL-5 et de l'IL-13. Ils interviendront dans les réponses contre les parasites tels que les helminthes. Les lymphocytes Th17 sont caractérisés par la production d'IL-17, d'IL-21 et d'IL-22 et participeront à la réponse lors des inflammations tissulaires et infections fongiques. La stimulation antigénique sur les lymphocytes T, notamment par les lymphocytes B CPA, permet de maintenir les lymphocytes Tfh (lymphocytes T folliculaires helper) qui eux continuent d'activer et de soutenir la réponse lymphocytaire B (Mitsdoerffer et al. 2010; Petersone et al. 2018). Les lymphocytes Tfh engendrent la production d'IL-21 et d'IL-4. Ils viennent en soutien à la réponse lymphocytaire B en participant notamment à la différenciation de ceux-ci en plasmocytes.

De manière précoce dans l'activation lymphocytaire, le CD25 (aussi appelé chaîne  $\alpha$  à l'IL-2) sera exprimé permettant la réponse à la cytokine IL-2 et ainsi la survie et la prolifération des lymphocytes activés. D'autres molécules telles que le CD69 et le CD40L caractérisent cet état d'activation des lymphocytes.

Il existe une autre sous population de lymphocytes T CD4 que sont les lymphocytes T régulateurs. Ces derniers interviennent dans l'homéostasie en permettant de réguler la réponse immunitaire. En effet, ils limitent la prolifération des lymphocytes T

effecteurs. La différenciation en lymphocyte T régulateurs sera induite grâce au facteur de transcription FoxP3 et ils produiront du Transforming Growth Factor- $\beta$  (TGF- $\beta$ ) et de l'IL-10.



**Figure 7 : Différenciation des lymphocytes T après leur activation.**

Sous l'effet de cytokines et de facteurs de transcription les lymphocytes T CD4 se différencient en lymphocytes Th1, Th2, Th17 ou Tfh. Suite à cette différenciation les lymphocytes produiront des cytokines selon leur type cellulaire caractéristiques de leur différenciation. IFN, interféron ; IL, interleukine ; Th, T helper ; Tfh, T follicular helper (Dong 2021).

#### d. La tolérance immunitaire

Alors que la réponse immunitaire envers un Ag pathogène s'éteindra avec son élimination, une exposition permanente de l'Ag (Ag du « soi » par exemple) nécessitera



une régulation de l'activation de la réponse immunitaire. Ce phénomène de régulation est appelé tolérance immunitaire et s'établit à deux niveaux. Le premier niveau est dit central et intervient au stade de différenciation des lymphocytes dans les OL primaires. Le second niveau, la tolérance périphérique, intervient dans les OL secondaires et les tissus après la différenciation des lymphocytes.

### La tolérance centrale

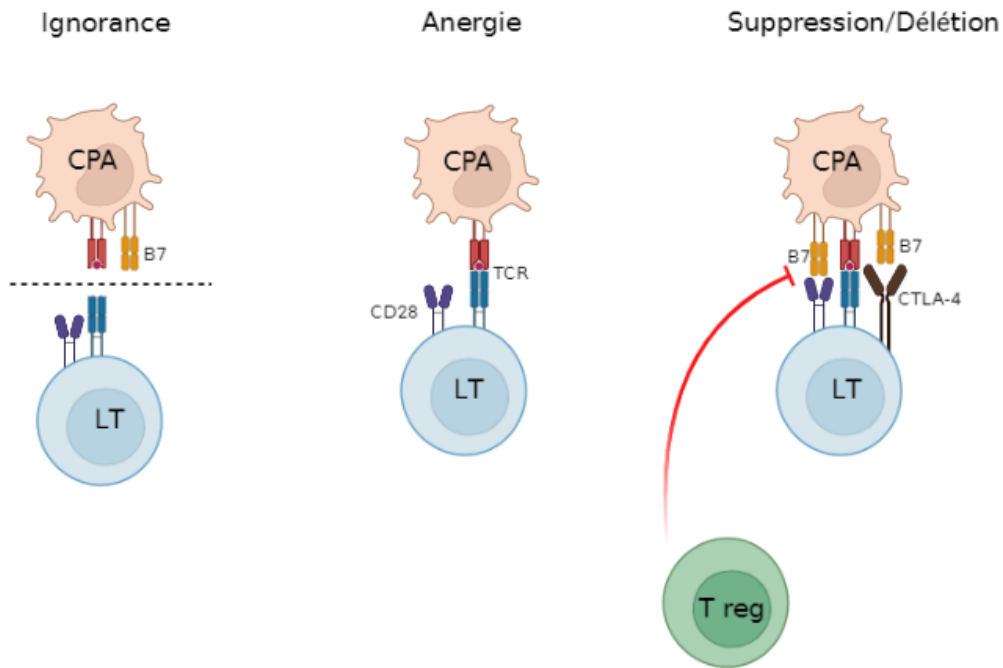
Le phénomène de tolérance centrale se déroule lors de la génération des lymphocytes, dans la moelle osseuse ou le thymus. A ce niveau les lymphocytes sont confrontés à de nombreux Ag. Dans le thymus, durant le processus de sélection positive, seuls les lymphocytes T exprimant un TCR fonctionnel et donc capable de reconnaître un Ag, survivront. Les cellules épithéliales médullaires thymiques expriment des Ag des tissus périphériques (Derbinski et al. 2001). Lorsque les lymphocytes réagissent fortement à un Ag présent, ils sont éliminés par apoptose. Ce phénomène est appelé sélection négative. Le facteur de transcription AIRE (autoimmune regulator) est responsable de la régulation de l'expression des Ag des tissus périphériques au sein du thymus (Lopes, Ferrier, et Irla 2015). Des mutations sur le gène *Aire* sont à l'origine du syndrome APECED (autoimmune polyendocrinopathy candidiasis ectodermal dystrophy), caractérisé par une candidose cutanéomuqueuse chronique, une hypoparathyroïdie et une insuffisance surrénalienne, où les lymphocytes T échappent à la sélection négative et migrent vers la circulation (Mathis et Benoist 2007).

Certains lymphocytes T CD4 immatures du thymus survivent malgré une forte réaction aux Ag et deviennent des lymphocytes T régulateurs, permettant le contrôle de la réponse immunitaire périphérique.

Concernant les lymphocytes B, les mécanismes de sélection s'effectuent dans la moelle osseuse. Lorsque ceux-ci sont trop réactifs, les gènes *RAG*, impliqués dans la recombinaison VDJ, sont à nouveau exprimés afin de permettre un réarrangement au niveau des régions V de leur BCR et ainsi diminuer la réactivité vis-à-vis de l'Ag (Halverson, Torres, et Pelanda 2004). Lorsque le processus de « receptor editing » n'a pas fonctionné, la sélection négative par apoptose s'applique. Ce processus est particulier aux lymphocytes B.

### La tolérance périphérique

Le phénomène de tolérance périphérique se réalise au niveau des OL périphériques, tels que la rate ou les ganglions lymphatiques, et ne concerne que les lymphocytes matures. Il est décrit plusieurs mécanismes de tolérance que sont l'ignorance, la suppression ou délétion et l'anergie (**Figure 8**).



**Figure 8 : Mécanismes de tolérance périphérique des lymphocytes T.**

Le mécanisme d'ignorance est défini par une absence de visibilité de l'Ag par le lymphocyte T *via* une barrière physiologique par exemple. Ce mécanisme est réversible. Dans le cas d'une présentation d'Ag sans signal de co-stimulation associé, une absence de réponse est observée, il s'agit de l'anergie. Enfin, des cellules T régulatrices peuvent intervenir et ainsi réguler la réponse des lymphocytes T trop réactifs. Cela entraîne un blocage de l'activation, il s'agit de la suppression ou délétion. CPA, cellule présentatrice d'Ag ; LT, lymphocyte T ; T reg, lymphocyte T régulateur ; TCR, T cell receptor.

Le mécanisme de l'ignorance correspond à l'absence d'interaction entre le lymphocyte T et l'Ag, par exemple lorsqu'une barrière physiologique est présente entre les deux intervenants. Ainsi, il est possible que pour un Ag présent au sein du système nerveux central (SNC), la barrière hématoencéphalique (BHE) empêche le contact entre le complexe Ag-CMH et le lymphocyte T. Ce phénomène s'observe également lorsque l'Ag n'est pas présent en quantité suffisante, ne permettant pas d'atteindre leur seuil d'activation. Ce mécanisme reste cependant réversible et une rupture de la BHE

ou la présence d'une grande quantité d'Ag par exemple, conduit à la reconnaissance de celui-ci par les lymphocytes T et leur activation.

L'anergie est définie par l'absence de réponse d'un lymphocyte T après qu'un Ag lui ait été présenté. Cette absence de réponse peut s'expliquer par le fait que la reconnaissance de l'Ag n'est pas associée à la présence de signaux de co-stimulation sur la CPA, ce qui ne permet pas l'activation du lymphocyte.

La suppression ou délétion est réalisée par les lymphocytes T régulateurs. Ces lymphocytes T régulateurs vont bloquer l'activation des lymphocytes effecteurs reconnaissant des Ag. Plusieurs mécanismes peuvent entrer en jeu afin de bloquer cette activation (Vignali, Collison, et Workman 2008). Un premier consiste en la production de cytokines inhibitrices telles que l'IL-10 ou TGF- $\beta$ . Un second intervient *via* la liaison du CTLA-4, ayant une affinité supérieure que CD28, avec B7 empêchant ainsi l'activation du lymphocyte T. Une compétition métabolique est également observée. Les lymphocytes T régulateurs, qui expriment le CD25, consomment l'IL-2 présent dans le milieu, ce dernier étant nécessaire à la survie des lymphocytes T effecteurs. Enfin, les lymphocytes T régulateurs peuvent exercer une action cytotoxique et entraîner la mort du lymphocyte T effecteur.

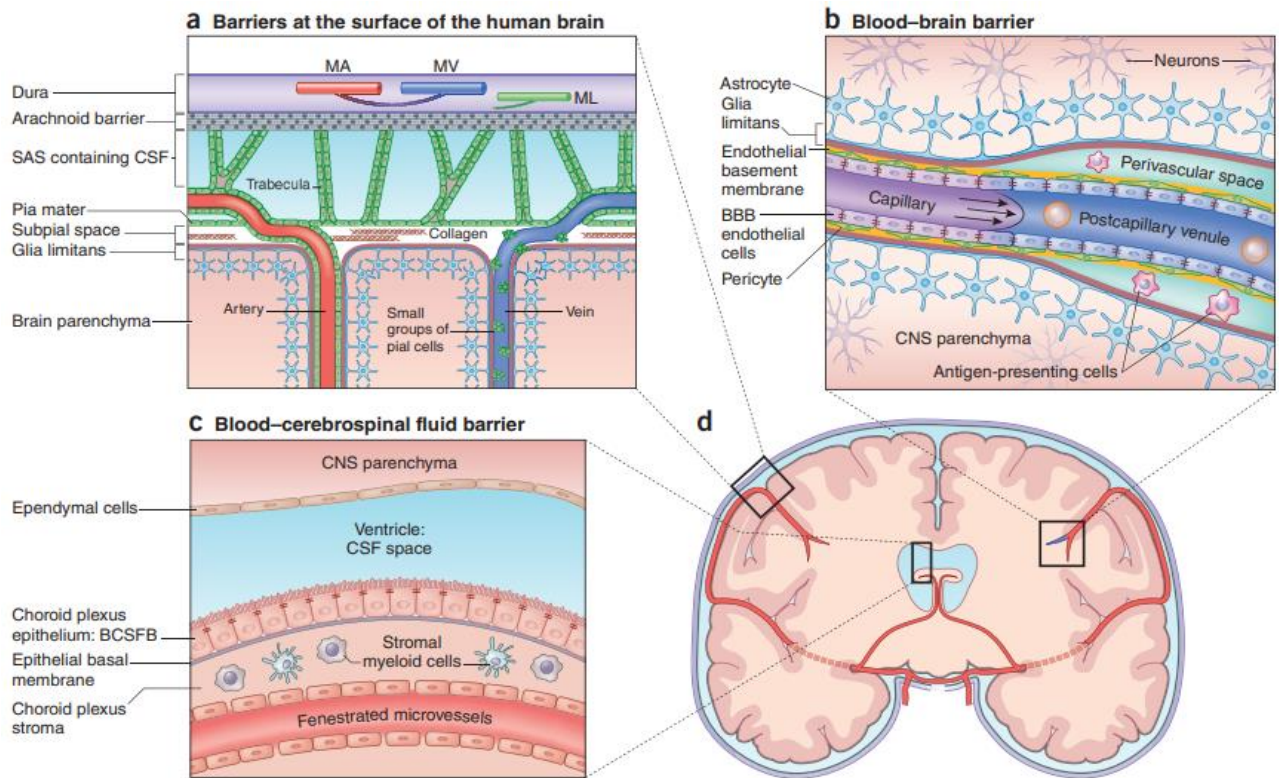
La tolérance périphérique des lymphocytes B se fait essentiellement par leurs interactions avec les lymphocytes T. Si les lymphocytes T auxiliaires ne sont pas activés ou absents alors il n'y aura pas de coopération entre ces deux types cellulaires et par conséquent pas d'activation du lymphocyte B. Ceux-ci peuvent aussi exprimer des signaux inhibiteurs, tel que Fas, conduisant à leur mort. Les lymphocytes T régulateurs peuvent également intervenir directement et contribuer à la tolérance des lymphocytes B (Ludwig-Portugall et al. 2008). D'autres cellules, telles que les

lymphocytes B régulateurs, peuvent intervenir dans la régulation de la réponse immunitaire (van de Veen et al. 2016).

Des mutations de *Foxp3* sont à l'origine du syndrome IPEX (immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome) (Bennett et al. 2001). Ces mutations provoquent l'inactivité des lymphocytes T régulateurs ce qui engendre un défaut dans la régulation de la réponse immunitaire. De nombreux organes sont touchés avec des entéropathies, endocrinopathies (troubles diabétiques ou thyroïdiques) ou encore des atteintes cutanées (Tan, Louie, et Sleasman 1993). Cette pathologie illustre l'importance des lymphocytes T régulateurs dans la régulation de la réponse immunitaire.

#### e. La réponse immunitaire adaptative dans le SNC

Immunologiquement parlant, le SNC est identifié comme une zone privilégiée où il n'y a pas de réponse immunitaire. Pour autant, Wekerle et collaborateurs ont pu souligner dès 1986 une immunosurveillance du SNC (Wekerle et al. 1986). En effet, des lymphocytes activés ont été mis en évidence dans le SNC, bien que ces cellules y soient en faible quantité. Cette notion d'immunosurveillance a été revue plus récemment avec des entrées au sein du SNC strictement contrôlées par les barrières formées au niveau des méninges et notamment l'arachnoïde et la pie-mère, des cellules endothéliales et la *glia limitans* formant la BHE et des plexus choroïdes (Figure 9) (Engelhardt, Vajkoczy, et Weller 2017).



**Figure 9 : Voies d'entrée des cellules immunitaires dans le SNC.**

A, Barrière méningée formée par l'arachnoïde et la pie-mère. B, Barrière formée par la BHE que les cellules immunitaires peuvent franchir au niveau des veinules post-capillaires. C, Barrière formée au niveau des plexus choroïdes responsables de la production du LCR, BCSFB. D, Localisation des trois barrières sur une coupe coronale de cerveau. SNC, système nerveux central ; BHE, barrière hémato encéphalique ; LCR, liquide céphalorachidien ; BCSFB, blood cerebrospinal fluid barrier. (Engelhardt, Vajkoczy, et Weller 2017).

### Voie d'entrée méningée

La voie d'entrée passant par les méninges est contrôlée au niveau de la barrière entre le sang et le liquide céphalorachidien (LCR). Les méninges sont constituées de trois membranes, la dure-mère, l'arachnoïde et la pie-mère. L'arachnoïde forme une barrière entre la dure-mère et le LCR (Engelhardt, Vajkoczy, et Weller 2017). En conditions physiologiques, plusieurs types de cellules immunitaires peuvent être

identifiés au niveau des leptoméniges (arachnoïde et pie-mère) : des lymphocytes T, des macrophages ou encore, bien qu'en faible quantité, des cellules dendritiques (Coles et al. 2017). Dans le cas d'une pathologie neuroinflammatoire telle que l'encéphalomyélite autoimmune expérimentale (EAE), des lymphocytes T se retrouvent au niveau du LCR suite à leur passage *via* les leptoméniges (Schläger et al. 2016). A ce même niveau, des lymphocytes T et B activés ont été mis en évidence à différents stades de la pathologie (Rua et McGavern 2018; Pol et al. 2019). De plus, l'analyse *post-mortem* de cerveaux de patients atteints de sclérose en plaques (SEP) primaire progressive, a montré que la quantité de lymphocytes présent dans les méniges est corrélée positivement avec une démyélinisation plus importante, la sévérité de la maladie et un décès précoce (Choi et al. 2012).

#### Voie d'entrée par la barrière hémato-encéphalique

La BHE est une barrière physiologique entre le sang et le SNC. Elle est composée des cellules endothéliales, recouvertes par les péricytes et les astrocytes, isolant ainsi le compartiment sanguin du parenchyme cérébral. Elle exerce un rôle de protection en empêchant les entrées de certaines entités telles que des toxines ou pathogènes au sein du SNC. Dans certaines conditions inflammatoires (infectieuses ou pathologiques), il est observé une infiltration de cellules immunitaires au sein du parenchyme cérébral *via* les veinules post-capillaires (Engelhardt, Vajkoczy, et Weller 2017). En effet, l'augmentation des molécules d'adhérence telles que ICAM (intercellular adhesion molecule) ou VCAM (vascular cell adhesion molecule) sur les épithéliums vasculaires lors d'une neuroinflammation permet le recrutement des lymphocytes et leur passage au travers de la BHE (Engelhardt et Ransohoff 2012; Steffen et al. 1996). C'est notamment le cas dans la SEP où suite à une perméabilisation de la BHE, des cellules immunitaires, dont des lymphocytes T CD4



et CD8, s'infiltrant au sein du parenchyme cérébral (Dendrou, Fugger, et Friese 2015). Ces cellules vont reconnaître la myéline entourant les neurones et il s'en suit une démyélinisation et mort neuronale conduisant à la symptomatologie (Korn 2008). La molécule d'adhérence leucocytaire (ALCAM) est impliquée dans cette pathologie le recrutement de lymphocytes B pro-inflammatoires pathogéniques ainsi que leur migration au travers de la BHE mais également de la barrière méningée (Michel et al. 2019).

### Voie d'entrée par les plexus choroïdes

Les plexus choroïdes forment une barrière à l'interface du compartiment sanguin et du LCR, appelée barrière sang-liquide cérébrospinal (BCSFB) (Engelhardt, Vajkoczy, et Weller 2017). Les plexus choroïdes sont formés par un épithélium cubique et localisés au niveau des 3<sup>e</sup> et 4<sup>e</sup> ventricules, ainsi qu'au niveau des ventricules latéraux du SNC (Gherzi-Egea et al. 2018). Les échanges avec le LCR, dont ils sont responsables de la sécrétion, sont très stricts. En condition inflammatoire, les molécules d'adhérence ICAM et VCAM sont surexprimées sur les épithéliums des plexus choroïdes, permettant le recrutement des lymphocytes (Steffen et al. 1996). De plus, suite à un pré-conditionnement par injection de LPS (lipopolysaccharide) et après injection dans les ventricules de lymphocytes T CD4 polarisés Th1, ceux-ci sont capables d'adhérer et de migrer au travers des plexus choroïdes (Strominger et al. 2018). Lors d'un accident vasculaire cérébral (AVC), les lymphocytes T circulent *via* la BCSFB pour entrer dans le parenchyme cérébral (Llovera et al. 2017). Dans l'EAE, des lymphocytes Th17 ont montré leur capacité à migrer à travers les plexus choroïdes jusque dans le SNC (Reboldi et al. 2009).



**Pour résumer :**

- Au sein de l'immunité on identifie l'immunité innée et adaptative avec une cinétique propre à chacune. L'immunité innée, qui est d'apparition précoce et de cinétique courte, et l'immunité adaptative d'apparition plus tardive et perdurant dans le temps.
- L'immunité adaptative est constituée des lymphocytes T et B qui mûrissent dans les OL.
- La réponse immunitaire adaptative dépend de la reconnaissance par les lymphocytes d'un Ag, pouvant mener à leur activation et nécessite pour les lymphocytes T plusieurs signaux.
- Plusieurs sous types de lymphocytes Th sont identifiés dont les Th1, les Th2, les Th17 et les Tfh. L'agent pathogène oriente leur différenciation et la sécrétion de cytokines qui en découle.
- Des mécanismes de tolérance centraux et périphériques permettent le contrôle de la réponse immunitaire.
- Le SNC est un milieu privilégié dans lequel les cellules immunitaires peuvent entrer dans certaines conditions et notamment les conditions pathologiques. Les voies d'entrées peuvent être situées au niveau des méninges, de la BHE ou des plexus choroïdes.

## 2. Le récepteur au N-Méthyl-D-Aspartate

### a. Le récepteur NMDA

#### Structure

Les NMDAR sont des récepteurs glutamatergiques qui tirent leur nom de leur ligand, le glutamate. Au sein de la famille des récepteurs glutamatergiques il est distingué 2 sous familles : les récepteurs métabotropiques et les récepteurs ionotropiques (Merino 2019). Les récepteurs métabotropiques sont des protéines membranaires qui répondent à la fixation d'un ligand entraînant une cascade d'activation. Ils sont également appelés récepteurs aux protéines G (RCPG). Les NMDAR font, eux, partie de la seconde sous famille et sont des récepteurs de type ionotropique formant un canal ionique laissant passer des ions suite à la fixation d'un neurotransmetteur et d'un co-agoniste. Ils possèdent pour substrats le neurotransmetteur glutamate et la glycine qui se fixeront sur les sous-unités GluN2 et GluN1 respectivement (Prybylowski et Wenthold 2004). Parmi la famille des récepteurs ionotropiques au glutamate, il peut être également cité les récepteurs  $\alpha$ -amino-3-hydroxy-5-méthylisoxazol-4-propionate (AMPA) et kaïnate mais qui ne font pas l'objet de notre étude (Paoletti, Bellone, et Zhou 2013).

Les NMDAR possèdent une structure hétéromérique composée de 4 sous-unités. Ces sous-unités sont composées obligatoirement de 2 sous-unités GluN1 et de 2 sous-unités GluN2 et/ou GluN3 (Prybylowski et Wenthold 2004). Il a été identifié 7 sous-unités au total, soit 1 sous-unité GluN1, 4 sous-unités GluN2 (nommées de A à D) et 2 sous-unités GluN3 (nommées A et B). Ces sous-unités sont codées respectivement par les gènes *GRIN1*, *GRIN2* et *GRIN3*. D'autre part, suite à l'épissage

alternatif, il est dénombré 8 isoformes théoriques de la sous-unité GluN1 (Regan, Romero-Hernandez, et Furukawa 2015).

Les sous-unités sont constituées des parties suivantes (**Figure 10**) :

- Le domaine extracellulaire :

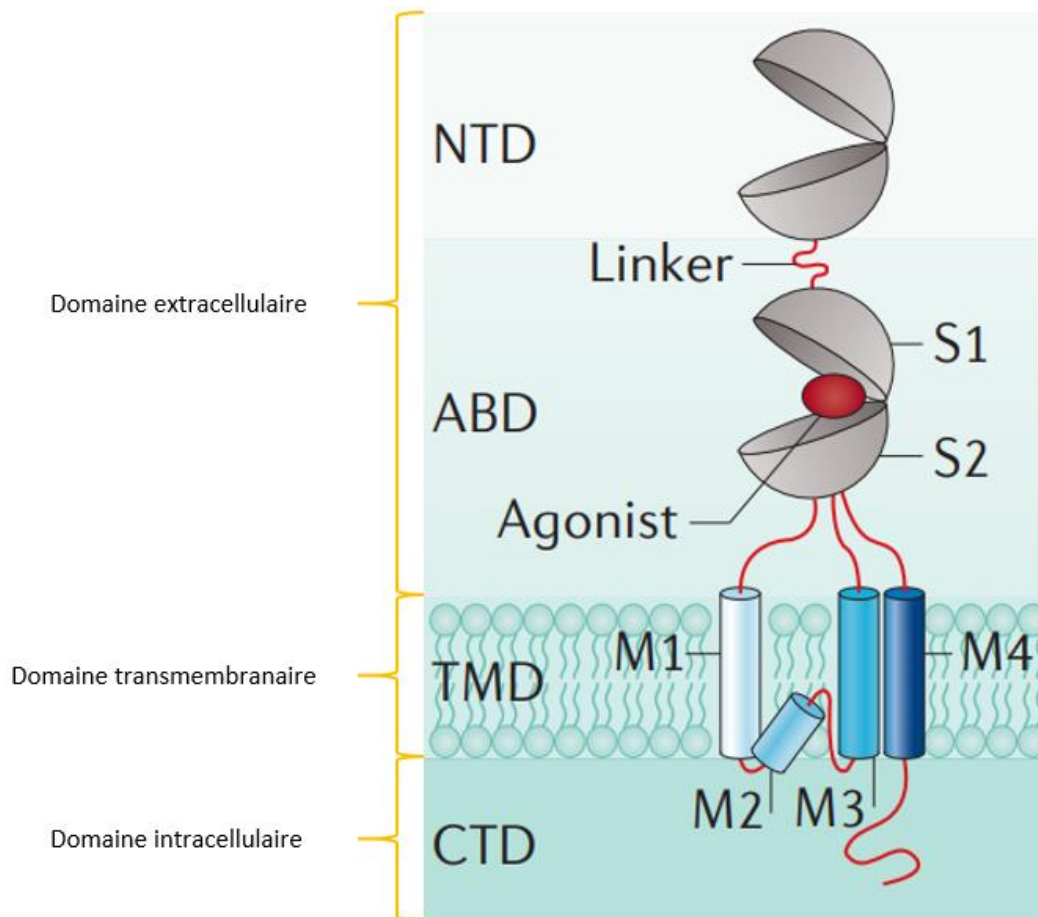
Ce domaine est composé de 3 parties. Il contient les sites de liaison aux ligands cités précédemment ainsi que la partie aminoterminal (NTD) du récepteur. Cette partie renferme les résidus N368/G369 décrits comme un des sites de fixation préférentiel des Ac anti-NMDAR dans l'EA (Dalmau, Geis, et Graus 2017).

- Le domaine transmembranaire :

Ce domaine est composé de 3 parties transmembranaires (hélices) et d'une boucle qui permet la sélection des ions entrant (Paoletti, Bellone, et Zhou 2013).

- Un domaine intracellulaire :

Le domaine intracellulaire est composé d'une seule partie. Celui-ci est impliqué dans l'ancrage et l'interaction avec les molécules de signalisation (Paoletti, Bellone, et Zhou 2013).



**Figure 10 : Représentation d'une sous-unité du NMDAR.**

Chaque sous-unité est divisée en plusieurs domaines : le domaine extracellulaire avec le site de liaison aux agonistes ABD et le NTD, le domaine transmembranaire formant le canal ionique TMD, et le domaine intracellulaire impliqué dans la signalisation CTD. ABD, domaine de liaison à l'Ac ; NTD, domaine aminoterminal ; TMD, domaine transmembranaire ; CTD, domaine cytosolique (Paoletti, Bellone, et Zhou 2013).

### Fonction

L'association des 4 sous-unités du récepteur va former un tunnel perméable aux ions calcium ( $\text{Ca}^{2+}$ ) et la liaison du glutamate et de son co-agoniste, la glycine, entraîne l'activation du récepteur et une potentialisation à long terme (Prybylowski et Wenthold 2004; Vyklícký et al. 2014). La potentialisation à long terme est un processus qui entraîne une activité des synapses pouvant aller de plusieurs heures à plusieurs semaines. Ce phénomène est impliqué dans les mécanismes d'apprentissage et de

mémorisation (Cotman et Monaghan 1988). A l'inverse, le magnésium ( $Mg^{2+}$ ) entrainera une inhibition du récepteur et est impliqué dans la régulation des phases de repos et d'activité du rythme circadien (Gielen 2010; Song et al. 2017).

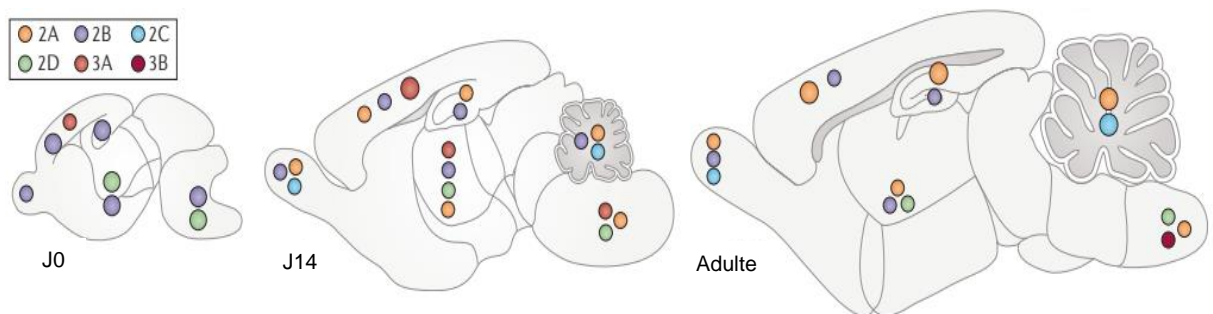
## b. Distribution du NMDAR dans l'organisme

### Localisation du NMDAR

Les NMDAR sont localisés dans le SNC, à la surface des neurones, où ils participent à l'activité synaptique. Une modulation due aux interactions avec différentes protéines, comme celles du cytosquelette peut avoir lieu, faisant évoluer la localisation des NMDAR de pré-synaptique à post-synaptique et inversement (Chatha et al. 2000). Sur la synapse, ils sont particulièrement localisés au niveau post-synaptique. A ce niveau, le glutamate relâché dans la fente synaptique, depuis la partie pré-synaptique du neurone, pourra se lier au NMDAR et ainsi permettre un influx de  $Ca^{2+}$  qui engendrera la potentialisation à long terme.

Au sein du SNC, ils sont principalement retrouvés dans l'hippocampe et dans le cortex (Petrulia, Yokotani, et Wenthold 1994). Il est à noter que l'expression des différentes sous-unités ainsi que leurs possibilités d'assemblage sera différente au cours du développement. Cependant, la sous unité GluN1 est, elle, ubiquitaire et ce peu importe le stade de développement (Gladding et Raymond 2011; Paoletti, Bellone, et Zhou 2013). Concernant la sous-unité GluN2, les sous-unités 2B et 2D sont majoritairement exprimées à la naissance. Durant l'enfance, l'ensemble des sous-unités GluN2 seront exprimées pour ne retenir que les sous-unités 2A, 2B et 2C à l'âge adulte. Il est à noter que la sous-unité GluN2B est présente depuis la naissance et qu'elle prédomine avec la sous-unité 2A dans le cortex et l'hippocampe ce qui laisse

suggérer un rôle central dans la fonction synaptique et la plasticité (Paoletti, Bellone, et Zhou 2013). Concernant la sous-unité GluN3A, elle se trouve exprimé à la naissance et perdure dans l'enfance pour laisser place ensuite à la sous-unité 3B à l'âge adulte (Figure 11) (Paoletti, Bellone, et Zhou 2013).



**Figure 11** : Répartition des sous-unités du NMDAR selon le stade de développement.

Les sous-unités GluN2B et 2D sont exprimées à la naissance alors que les sous-unités 2A et 2C apparaissent plus tardivement. La sous-unité GluN3 est également présente à tous les stades avec une prédominance durant l'enfance. A l'âge adulte, seule GluN3B est exprimée. Quant à la sous-unité GluN1 (non représentée), elle est présente à tous les stades de développement (Paoletti, Bellone et Zhou 2013).

Les NMDAR sont également retrouvés sur d'autres structures du SNC, extra-synaptiques, telles que les astrocytes (Schipke et al. 2001) ou encore les cellules endothéliales (Macrez et al. 2016). Ils ont également été décrit sur des organes périphériques tels que les reins, les poumons, le foie, le cœur, l'estomac ainsi que le système immunitaire (Du, Li, et Li 2016).

## Récepteurs à l'éphrinB et au NMDA

Les éphrines sont des protéines qui interagissent avec les récepteurs éphrine B2 (EphB2) à activité tyrosine kinase. Les interactions entre récepteur et ligand sont impliquées dans la formation de la synapse et la plasticité neuronale (Lai et Ip 2009). Le récepteur EphB2 a été localisé sur la synapse de neurones hippocampiques de rat par l'équipe de Torres et collaborateurs. Le récepteur EphB2 pourrait jouer un rôle dans la stabilisation de la synapse ou comme une molécule permettant l'adhérence (Torres et al. 1998).

Une co-localisation des récepteurs EphB2 et NMDAR a pu être mise en évidence au niveau neuronal (Dalva et al. 2000). Les interactions entre ces deux récepteurs sont impliquées dans la localisation du NMDAR sur la synapse et son maintien au niveau post synaptique (Washburn et al. 2020). Il a été montré que lorsque l'interaction entre ces deux récepteurs n'avait plus lieu, les NMDAR se trouvaient délocalisés au niveau latéral plutôt qu'au niveau synaptique (Mikasova et al. 2012). Cette délocalisation empêche le bon fonctionnement synaptique et un défaut de signalisation par les NMDAR peut être à l'origine de troubles neurologiques, tel que dans la schizophrénie par exemple où il est observé une hypofonctionnalité du NMDAR (Gonzalez-Burgos et Lewis 2012; Jézéquel et al. 2017). Un autre exemple, lors d'une EA à Ac anti-NMDAR, pathologie impliquant des auto-Ac, ces derniers se lieront spécifiquement aux NMDAR (cf partie 3.c.) et cette liaison sera à l'origine d'une diminution des interactions entre le NMDAR et le récepteur à l'EphB2, déstabilisant le NMDAR (Mikasova et al. 2012). Une étude a également montré que le récepteur EphB2 peut se révéler être une cible thérapeutique dans le traitement de l'EA à Ac anti-NMDAR. En effet, lors d'une injection simultanée d'IgG de patients et du ligand du récepteur EphB2, directement dans la partie de l'hippocampe dorsal des souris, une inversion partielle des effets des

IgG sur l'expression des NMDAR est observée (Mikasova et al. 2012). Le ligand à l'EphB2 pourrait donc permettre de prévenir en partie les effets des Ac sur les NMDAR.

### c. Pathologies impliquant le NMDAR

Les NMDAR jouent un rôle central dans la transmission synaptique et l'activité neuronale au sein du SNC. Ainsi, des altérations de ces récepteurs peuvent être impliquées dans diverses pathologies.

La sur-activation des NMDAR semble jouer un rôle dans la maladie d'Alzheimer (Gladding et Raymond 2011). Une activation chronique des récepteurs renforce la formation des plaques  $\beta$  amyloïdes, elles-mêmes à l'origine de la pathologie. De plus, cette activation induit une surexpression de la protéine tau qui est bien connue pour former des agrégats dans la maladie d'Alzheimer (Babaei 2021).

A l'inverse, il a été montré une hypofonction du NMDAR chez les patients atteints de schizophrénie (Bitanirwe et al. 2009). En effet, l'étude de l'expression des ARNm au sein du cerveau en post-mortem a mis en évidence une plus faible densité de la sous-unité GluN2A chez ces patients suggérant un déficit de la neurotransmission glutamatergique dans la pathologie.

Une hyper ou hypofonction du NMDAR sont impliquées dans des pathologies neurologiques telles que celles vues précédemment. Dans le cadre des pathologies autoimmunes, ce sont des Ac anti-NMDAR qui sont identifiés. Par exemple, chez les patients atteints de lupus érythémateux disséminé il s'agit d'Ac dirigés contre la sous-unité GluN2 du NMDAR (DeGiorgio et al. 2001). Ces Ac sont retrouvés à des



concentrations élevées dans le LCR des patients et sont corrélés avec les syndromes neurologiques (Arinuma, Yanagida, et Hirohata 2008; Yoshio et al. 2006).

Notre pathologie d'étude, l'EA à Ac anti-NMDAR, fait également état d'Ac agissants sur le NMDAR (Dalmau, Geis, et Graus 2017). Cette pathologie fait l'objet d'une partie spécifique détaillée ci-après.

**Pour résumer :**

- Le NMDAR est un récepteur glutamatergique de type ionotropique.
- Il est composé de 4 sous-unités réparties entre les sous-unités GluN1, GluN2 et GluN3.
- Les récepteurs sont retrouvés sur les neurones majoritairement dans l'hippocampe et le cortex où leur activation induit une potentialisation à long terme impliquée dans l'apprentissage et la mémorisation.
- Plusieurs pathologies touchent le NMDAR dont l'EA à Ac anti-NMDAR.

### 3. L'encéphalite autoimmune à auto anticorps anti-récepteur au N-Methyl-D-Aspartate

#### a. Pathologies autoimmunes

Les maladies autoimmunes résultent de dysfonctionnements du système immunitaire et plus particulièrement d'une rupture de tolérance aux Ag du soi. Le développement de la réaction autoimmune est caractérisé par à la fois l'accumulation de lymphocytes T effecteurs accompagné ou non d'une diminution du taux de lymphocytes T régulateurs ce qui permet le maintien de la réaction immunitaire et l'apparition des symptômes de la maladie (Rosenblum, Remedios, et Abbas 2015).

Le facteur déclenchant des pathologies autoimmunes est souvent inconnu mais il est acquis que celles-ci sont liées à des facteurs génétiques et/ou des facteurs environnementaux (Rosenblum, Remedios, et Abbas 2015). Parmi les maladies autoimmunes il est distingué celles dites spécifiques d'organes et celles dites non spécifiques d'organes.

#### Maladies non spécifiques d'organes

Les maladies non spécifiques d'organes sont définies par l'atteinte de différents organes. C'est le cas par exemple du lupus érythémateux disséminé. Bien que l'étiologie exacte ne soit pas connue, les auto-Ac reconnaissent des cellules apoptotiques et nécrotiques, et touchent de nombreux organes tels que la peau, les reins, le SNC... (Mathian, Arnaud, et Amoura 2014). Des complexes immuns constitués des auto-Ac anti-ADN se forment et se déposent dans les différents organes induisant les lésions tissulaires de gravité variable (Mathian, Arnaud, et Amoura 2014).

## Maladies spécifiques d'organes

Les maladies spécifiques d'organes vont quant à elles toucher spécifiquement un organe. Les cellules cytotoxiques ou les auto-Ac produits reconnaissent les Ag exprimés par un organe en particulier. C'est le cas de la SEP où les Ac et les cellules lymphocytaires T impliquées vont cibler la gaine de myéline des neurones au sein du SNC entraînant une démyélinisation et la formation de plaques à l'origine des symptômes de la maladie (Dendrou, Fugger, et Friese 2015).

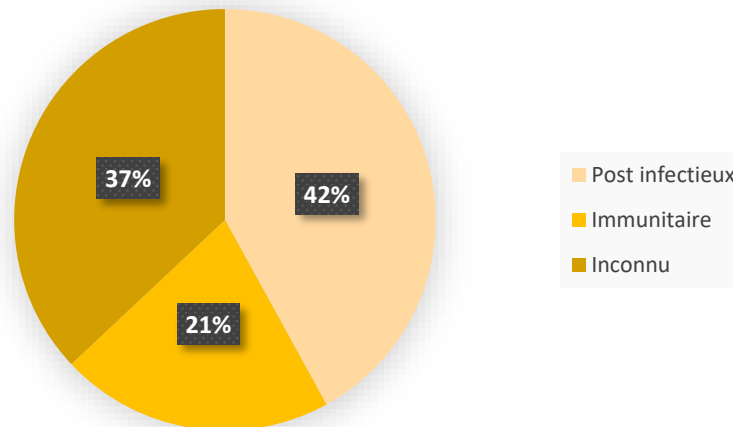
La pathologie faisant l'objet de notre étude, l'EA à Ac anti-NMDAR, se situe également dans cette catégorie puisque ciblant les NMDAR exprimés par les neurones dans le SNC.

### b. Epidémiologie

#### Les encéphalites

L'encéphalite est une pathologie résultant d'une inflammation du SNC. Il s'agit d'une maladie rare avec une incidence de l'ordre de 7 cas pour 100 000 habitants par an, associée à une mortalité et morbidité élevée (Venkatesan 2015). Le faible nombre de patients rend l'étude de cette pathologie complexe. Lorsque la maladie n'est pas fatale, les patients présentent généralement des séquelles cognitives et comportementales entraînant des difficultés à la réintégration sociale et affectant leur qualité de vie (Venkatesan 2015). Les étiologies exactes de cette pathologie sont encore mal connues mais plusieurs origines ont pu être mises en évidence. C'est ainsi que lors d'un recensement des cas d'encéphalites en Angleterre, dans une étude prospective sur 2 ans, Granerod et collaborateurs ont mis en évidence une origine

post-infectieuse dans 42% des cas, une origine immunitaire dans 21% des cas et restaient d'origine inconnue dans 37% des cas (**Figure 12**) (Granerod et al. 2010).



**Figure 12 : Répartition des encéphalites selon leur origine.**

Les encéphalites peuvent être répertoriées dans différentes catégories que sont les encéphalites d'origine infectieuse, les encéphalites d'origine immunitaire et les encéphalites d'origine inconnue.

### Les encéphalites autoimmunes à auto-Ac anti-NMDAR

Parmi les encéphalites ayant une origine immunitaire on dénombre actuellement 16 types d'EA dans lesquelles des auto-Ac ciblant les récepteurs neuronaux ou les protéines engagées dans la signalisation synaptique sont impliqués (Dalmau, Geis, et Graus 2017). Une d'entre elles est l'EA à auto-Ac anti-NMDAR. Cette pathologie a été initialement et récemment décrite par Dalmau et collaborateurs avec notamment la mise en évidence d'auto-Ac anti-NMDAR chez des patientes atteintes d'une encéphalite associée à un tératome ovarien (Dalmau et al. 2007).

L'EA à Ac anti-NMDAR touche environ 1,5 millions de personnes chaque année au niveau de la population mondiale (Dalmau et al. 2019). Elle touche toutes les tranches d'âge de la population allant de l'âge de 8 mois à 85 ans. Néanmoins, elles ne sont pas toutes représentées de la même façon avec un âge médian de déclaration de la pathologie à 21 ans et seulement 5% des patients sont âgés de 45 ans ou plus (Titulaer et al. 2013). Il est rapporté qu'environ 40% des patients sont âgés de moins de 18 ans. Comme il est couramment retrouvé dans les pathologies autoimmunes, l'EA touche préférentiellement les femmes avec un sexe ratio de 8 femmes pour 2 hommes (Titulaer et al. 2013). Il semblerait que les hommes atteints soient plus représentés au niveau des tranches d'âge extrêmes de la maladie (inférieur à 12 ans et supérieur à 45 ans).

### Etiologie

Bien que l'EA à Ac anti-NMDAR reste d'étiologie majoritairement inconnue, il apparait que dans 40% des cas elle est associée à une néoplasie sous-jacente faisant de cette pathologie un syndrome paranéoplasique (Titulaer et al. 2013). Plus de 90% des tumeurs identifiées dans ce contexte se trouvent être des tératomes ovariens. Les tératomes sont composés des 3 feuilletts embryonnaires ce qui leur confèrent la capacité de pouvoir former l'ensemble des tissus de l'organisme. Ainsi, il est possible de retrouver dans ce tératome du tissu nerveux exprimant des NMDAR, ce qui sera à l'origine de la production des auto-Ac (Iemura et al. 2018). La recherche d'un tératome ovarien est donc essentielle lors du diagnostic d'EA à Ac anti-NMDAR chez une femme.

Une autre étiologie possible de la pathologie serait une infection préalable à Herpes Simplex Virus (HSV) (Dalmau, Geis, et Graus 2017). En effet, 20% des

patients ayant été infectés par HSV et présentant une encéphalite virale développeraient des Ac contre les protéines de surface neuronales et notamment les NMDAR, responsables de l'apparition d'une EA à Ac anti-NMDAR. D'autres infections, telles que les infections par les entérovirus ont été mises en évidence (Gable et al. 2009). Une étude récente a également mis en avant la production d'Ig intrathécales dirigées contre d'autres virus, dits neurotropiques, tels que les Epstein Barr Virus (EBV), le virus de la varicelle et du zona, le virus de la rubéole ou encore celui de la rougeole (Schwenkenbecher et al. 2021).

Aussi, il a été évoqué un potentiel lien entre une infection par le SARS-CoV-2, responsable de la Covid-19, et la déclaration d'une EA à Ac anti-NMDAR aussi bien chez des patients adultes que pédiatriques (Panariello et al. 2020; Sarigecili et al. 2021). Bien que plusieurs cas de ce type aient été rapportés il est cependant encore trop tôt pour établir une corrélation forte entre ces deux pathologies.

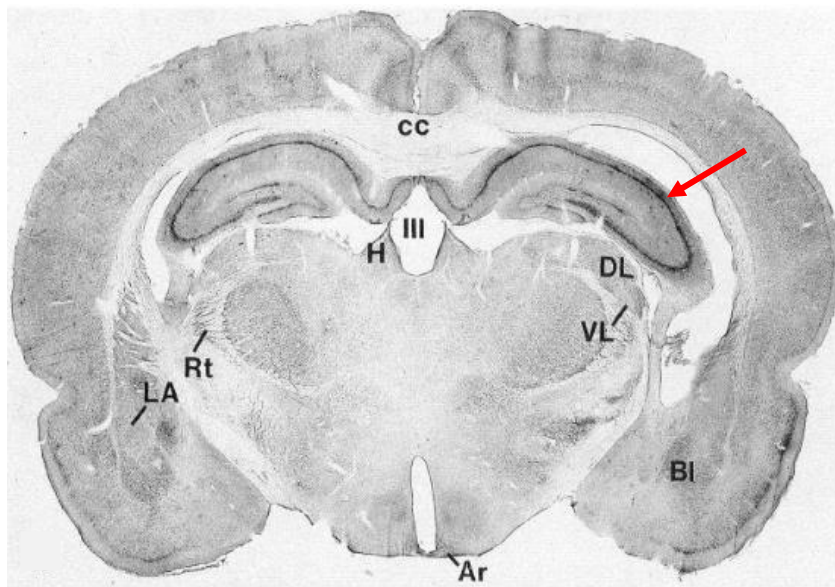
### Les encéphalites autoimmunes à auto anticorps anti-NMDAR : cas pédiatriques

Une récente étude coréenne des cas pédiatriques (inférieurs à 18 ans) d'EA à Ac anti-NMDAR a montré un sexe ratio comparable à celui de la population adulte avec une proportion de 75% de jeunes filles (Shim et al. 2020). 30% de celles-ci présentaient un tératome ovarien. Une seconde étude fait état de résultats similaires quant à la proportion de jeunes filles touchées (Wright, Hacoheh, et al. 2015). Cependant le nombre de tératomes ovariens associés est nettement inférieur puisqu'il ne concerne qu'une seule patiente. Ces études réalisées à plusieurs années d'intervalle et sur deux continents différents tendent vers les mêmes conclusions concernant les cas d'EA à Ac anti-NMDAR. Il est possible de les penser

représentatives de la pathologie au sein de cette population pédiatrique bien que le nombre de patients soit assez faible (32 et 31 patients respectivement) et que chacune précise que le nombre de cas est probablement sous-évalué.

### c. Les Ac anti-NMDAR

Comme son nom l'indique, l'EA à Ac anti-NMDAR est caractérisée par la production d'Ac ciblant spécifiquement les NMDAR et notamment ceux au niveau de l'hippocampe, zone identifiée comme étant riche en NMDAR post-synaptiques (**Figure 13**) (Petralia, Yokotani, et Wenthold 1994).

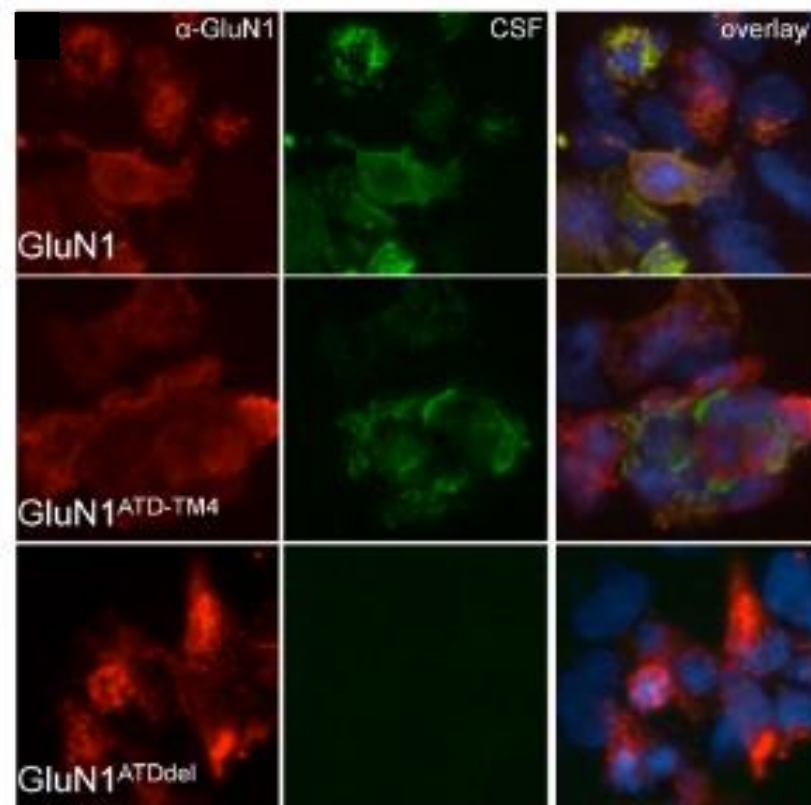


**Figure 13 : Localisation des NMDAR au niveau du SNC.**

Coupe transversale de cerveau de rat incubée en présence d'un Ac anti sous-unité GluN1 du NMDAR. Le marquage est essentiellement retrouvé au niveau de la zone hippocampique (flèche rouge) (Petralia, Yokotani, et Wenthold 1994).

Dans l'EA à Ac anti-NMDAR, il a été montré que, pour que les Ac pathologiques puissent se fixer sur leur site de liaison (ABD), le ATD de la sous-unité GluN1 devait être présent (Dalmau et al. 2008). Des cellules HEK 293 (Human Embryonic Kidney), qui ont la propriété d'être facile à cultiver et à transfecter, sont modifiées pour exprimer la sous-unité GluN1 du NMDAR. A l'aide de ces cellules, il a été mis en évidence une fixation des auto-Ac, issus du LCR des patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR sur ce récepteur et plus particulièrement sa sous-unité GluN1 (**Figure 14**) (Gleichman et al. 2012). Seul le domaine ATD de la sous-unité GluN1 est nécessaire et est suffisant pour la liaison de l'Ac à sa cible. Lorsque cette unité GluN1 était présente mais délestée de son domaine ATD, il n'était plus observé de fixation des Ac.





**Figure 14** : Identification de la sous-unité impliquée dans la liaison de l'Ac au NMDAR.

Le LCR de patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR a été incubé en présence de cellules HEK transfectées exprimant la sous-unité GluN1 du NMDAR, délestée (ATDdel) ou non de son domaine ATD. Les Ac contenus dans le LCR révélés par immunofluorescence se lient spécifiquement au domaine ATD de la sous unité GluN1 du récepteur. Un Ac commercial a été utilisé comme contrôle pour cibler la sous-unité GluN1 du NMDAR. ATD, domaine aminoterminal ; CSF, liquide céphalorachidien (Gleichman *et al.* 2012).

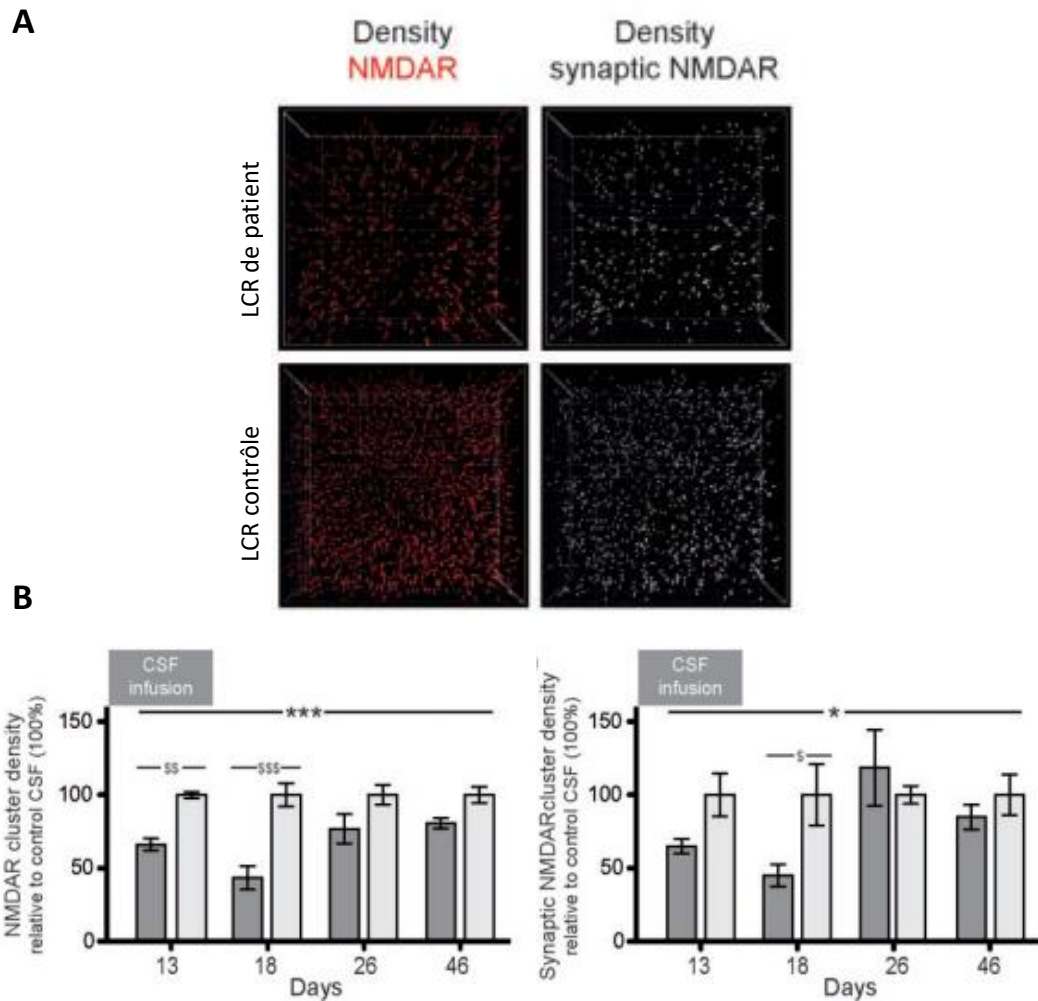
#### d. Effets des Ac anti-NMDAR

##### Diminution de l'activité des NMDAR

Lorsqu'ils sont injectés en intraventriculaire chez la souris, les Ac anti-NMDAR produits par les patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR sont capables d'induire des troubles similaires à ceux retrouvés chez ces patients, à savoir des troubles de la

mémoire et du comportement (Planagumà et al. 2015). Au-delà de ces troubles, une étude plus fine sur l'hippocampe des souris injectés avec le LCR de patients, contenant les Ac, montre une diminution de la densité des NMDAR totaux et synaptiques dans cette région (**Figure 15A**) (Planagumà et al. 2015). Aussi, *in vitro*, l'effet sur les NMDAR est réversible après suppression des Ac puisqu'à 26 jours après injection du LCR il n'est plus observé de différence dans la densité des NMDAR entre les animaux traités avec le LCR de patients et ceux traités avec le LCR témoin (**Figure 15B**).

*In vitro*, la mise en contact de LCR de patients contenant des Ac anti-NMDAR avec des oligodendrocytes, cellules du SNC exprimant également le NMDAR, a montré par une méthode d'imagerie du calcium cytosolique une diminution significative de l'activation des NMDAR (Matute et al. 2020). Il est à noter que ces Ac n'entraînent pas de modification du nombre de synapses, de la morphologie ou de la viabilité de culture primaire de neurones (Hughes et al. 2010).



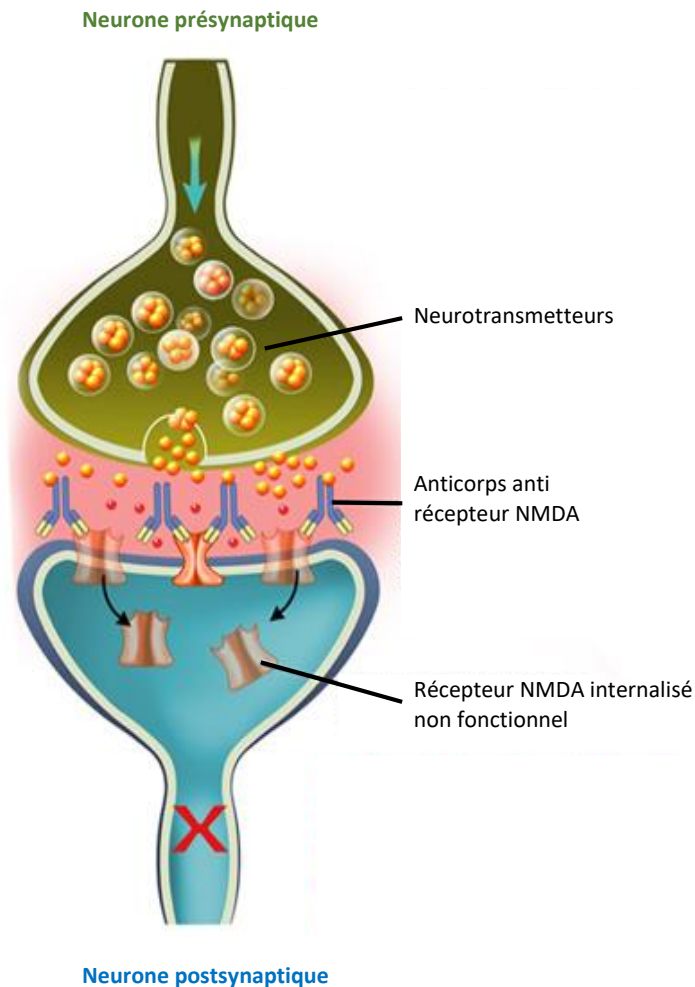
**Figure 15 : Effet des Ac de patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR sur l'hippocampe de souris.**

A, Représentation tridimensionnelle de la densité de cluster de NMDAR totaux et synaptiques à la suite de l'injection de LCR de patients contenant des IgG anti-NMDAR vs du LCR de patients témoin. B, Représentation du taux de NMDAR totaux et synaptiques à différents jours suivant l'injection intraventriculaire des IgG de patients (gris foncé) comparé aux contrôles (gris clair) (\* $p < 0,05$ , \*\* $p < 0,01$ , \*\*\* $p < 0,001$  ; Planagumà et al. 2015).

### Internalisation des NMDAR

Il a été montré que le LCR des patients mis en contact avec des neurones exprimant le NMDAR entraînait une internalisation de ceux-ci (Moscatto et al. 2014) (Figure 16). Cette internalisation semble atteindre un plateau même en présence

continue d'Ac. Une hypofonction des récepteurs sera malgré tout observée. Une fois les récepteurs internalisés au sein de la cellule, ils suivront une voie lysosomale de recyclage et de dégradation (Moscato et al. 2014).



**Figure 16** : Illustration du mécanisme d'internalisation des NMDAR dans l'EA à Ac anti-NMDAR.

Les Ac se fixent aux NMDAR du neurone post-synaptique ce qui induit leur internalisation au sein du neurone. Les neurotransmetteurs du neurone pré-synaptique déversés dans la fente synaptique n'ont plus de récepteurs où se fixer ce qui empêche l'influx de  $Ca^{2+}$  et donc l'induction de la potentialisation à long terme (Heda 2017).

L'hypofonction des NMDAR est due à leur internalisation par la liaison avec les Ac. Une étude dans un modèle d'EA à Ac anti-NMDAR chez le rongeur a pu montrer qu'un blocage de la réponse lymphocytaire B, par déplétion de ceux-ci, conduisait à une diminution des lymphocytes B activés et une diminution de la production d'Ac, entraînant une réduction des symptômes chez l'animal (Wagnon et al. 2020). Cette étude démontre bien l'implication des lymphocytes B dans cette maladie ainsi que le caractère pathologique des Ac anti-NMDAR.

### e. Manifestations cliniques

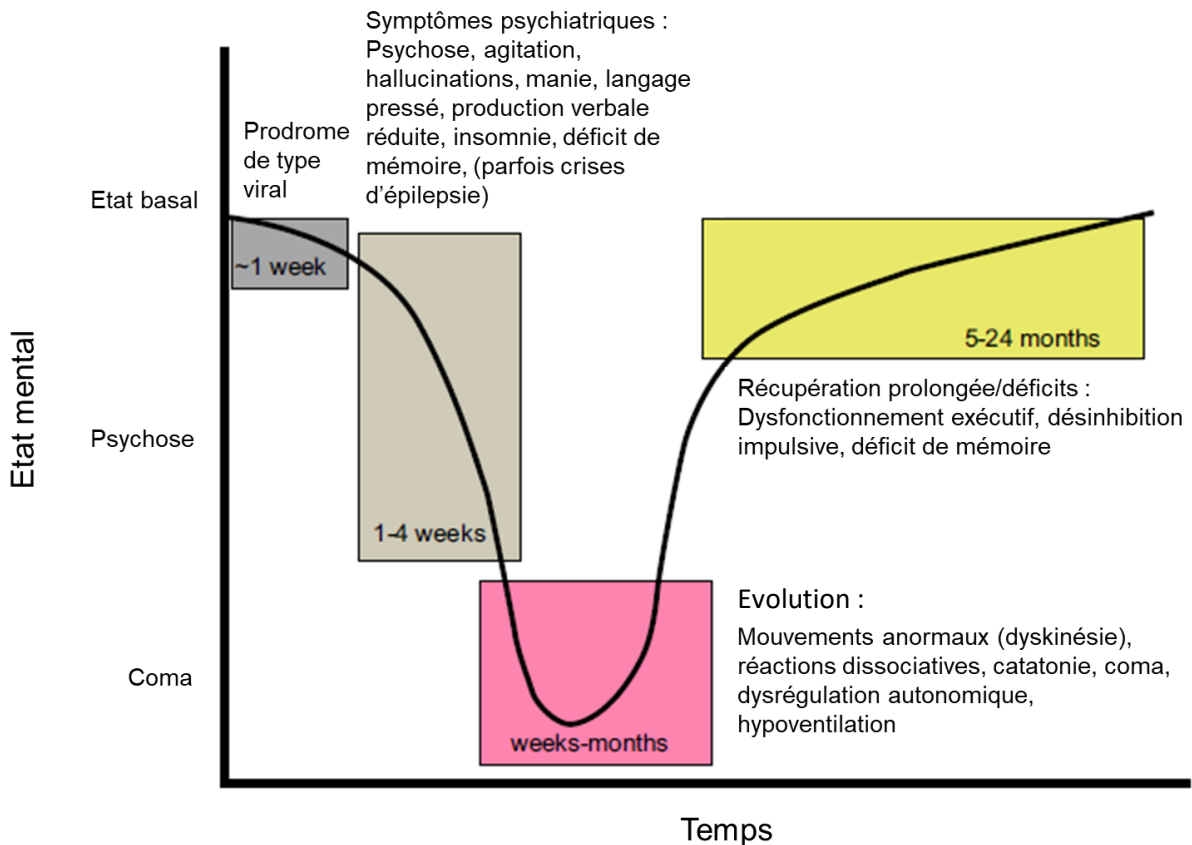
#### Tableau clinique et évolution

L'évolution de l'EA à Ac anti-NMDAR a été revue et résumée par l'équipe de Dalmau et collaborateurs (**Figure 17**) (Dalmau, Geis, et Graus 2017). Dans une première phase les manifestations sont non spécifiques faisant évoquer un syndrome pseudo-grippal chez des patients présentant des céphalées associées ou non à de la fièvre. Cette phase est appelée la phase virale prodromique. Elle est d'une durée courte, de l'ordre de quelques jours, et cède rapidement place à la phase suivante.

Quelques jours après, les patients présentent des symptômes de type psychiatrique tels que des hallucinations, anxiété, changement de comportement (agressivité), ... Ces éléments évoquent en premier lieu une pathologie psychiatrique, telle que la schizophrénie, et faisaient orienter initialement 77% des patients vers des psychiatres (Dalmau et al. 2008; Lamarque et al. 2011) par méconnaissance de l'EA à Ac anti-NMDAR. L'évolution de la maladie entraîne les patients en quelques semaines dans une phase de coma qui nécessitera une prise en charge en soins intensifs. Cette phase de coma peut s'étendre de quelques semaines à plusieurs mois

et conduire au décès des patients. Cette période de coma sera caractérisée par des phases d'alternance entre agitation et catatonie, de la tachycardie et de l'hypertension, une hypoventilation, ...

La phase de récupération permet la sortie des soins intensifs. Celle-ci peut s'avérer très longue, allant de plusieurs mois à plusieurs années. Durant cette phase les patients récupéreront au fur et à mesure leurs facultés mais de nombreux patients garderont des séquelles avec notamment des troubles de la mémoire, parfois des troubles du langage. Ces séquelles peuvent s'avérer très handicapantes et parfois ne permettent pas une bonne réintégration sociale (Dalmau, Geis, et Graus 2017; Titulaer et al. 2013).



**Figure 17 : Evolution d'une EA à Ac anti-NMDAR.**

La première phase, relativement courte, est la phase virale prodromale. Elle est suivie par l'apparition de symptômes de type psychiatrique se manifestant pendant quelques semaines. L'évolution de la maladie peut nécessiter une prise en charge en soins intensifs. La récupération survient après plusieurs mois et des séquelles peuvent persister (Dalmou, Geis, et Graus, 2017).

Par l'étude physiopathologique de l'EA à Ac anti-NMDAR, les déficits de mémoire observés dans les symptômes cliniques ont été expliqués par la fixation des Ac sur les NMDAR au sein de l'hippocampe. En effet, l'hippocampe est un organe connu pour son implication dans les processus relatifs à l'apprentissage et les processus mnésiques notamment en lien avec les NMDAR (Barry et Maguire 2019).

## Population pédiatrique

Les manifestations cliniques chez la population pédiatrique sont à type de psychoses et changements de comportement dans 90% des cas (Shim *et al.* 2020). La fièvre est un symptôme également très présent dans près de 80% des cas. Ces symptômes sont similaires à ceux retrouvés dans la population adulte. Une autre étude réalisée au Royaume-Uni fait état de résultats similaires tant sur le sexe ratio que des troubles cognitifs retrouvés dans 90% des cas (Wright, Hacoen, *et al.* 2015).

### f. Diagnostic

#### Examen

Lors d'une EA à Ac anti-NMDAR il est essentiel de poser le diagnostic rapidement afin de débiter la prise en charge adaptée le plus tôt possible. Depuis quelques années le diagnostic de cette pathologie s'est nettement amélioré grâce notamment à une description de la pathologie par Dalmau et collaborateurs (Dalmau *et al.* 2007).

L'examen clinique du patient est essentiel pour établir un diagnostic différentiel avec une quelconque pathologie psychiatrique. Ainsi, l'équipe de Dalmau et collaborateurs ont défini une grille reprenant les différents symptômes cliniques qui peuvent être observés au cours de l'EA à Ac anti-NMDAR permettant d'aider au diagnostic et d'orienter au mieux la prise en charge (**Figure 18**) (Dalmau *et al.* 2019). Ces symptômes non spécifiques sont d'apparition rapide, sans antécédents et dans plus de 80% des cas précédés par des prodromes de type viraux (Dalmau *et al.* 2008).



Des crises d'épilepsie, des dyskinésies ou mouvements anormaux sont fréquemment observés.

S	Défaut de sommeil Sleep dysfunction
E	Excitation, désinhibition ou manie en alternance avec comportement dépressif Excitement, disinhibition or manic behavior alternating with depressive behavior
A	Agitation ou agressivité Agitation or aggression
R	Apparition rapide Rapid onset
C	Prédominance chez le jeune adulte ou l'enfant Children and young adult predominance
H	Absence d'historique psychiatrique History of psychiatric disease absent
F	Catatonie fluctuante Fluctuating catatonia
N	Symptômes positifs ou négatifs au départ Negative and positive symptoms at presentation
M	Déficit de mémoire Memory deficit
D	Baisse du débit de langage ou mutisme Decrease of verbal output or mutism
A	Intolérance aux antipsychotiques Antipsychotic intolerance
R	Élimination d'un syndrome malin des neuroleptiques Rule out neuroleptic malignant syndrome
A	Anticorps et tests paracliniques associés (EEG, IRM ou LCR) Antibodies and additional paraclinical test (EEG, MRI or CSF)

**Figure 18 : Tableau d'aide au diagnostic positif d'une EA à Ac anti-NMDAR.**

Les arguments répertoriés font référence aux symptômes cliniques caractéristiques qui sont ou non présents lors de cette pathologie (Dalmau et al. 2019).

### Examens complémentaires

Des examens complémentaires peuvent être réalisés et sont nécessaire à l'orientation du diagnostic lorsque celui-ci n'est pas encore établi. Ainsi, une IRM (imagerie à résonance magnétique) peut être réalisée afin d'observer d'éventuelles anomalies telles qu'une hyper intensité de signal dans notamment l'hippocampe et le cortex (Dalmau et al. 2007). Cependant, cet examen sera dans 50% des cas non contributif pour le diagnostic (Dalmau et al. 2011). Un autre examen, l'électro-encéphalogramme (EEG), permettant d'évaluer l'activité électrique du cerveau, se trouve modifié chez de nombreux patients et nécessite une attention particulière afin

de prendre en charge le mieux possible les crises de type épilepsie pouvant survenir (Gómez Ávila et al. 2021). Il est à noter que même si l'EEG se trouve souvent modifié dans le cadre de cette pathologie, il n'est pas retrouvé de tracé spécifique à cette encéphalite (Gómez Ávila et al. 2021). La recherche d'une tumeur, notamment un tératome ovarien, fait partie des examens complémentaires devant des signes cliniques évocateurs, du fait de leur forte association avec l'EA à Ac anti-NMDAR (Dalmau et al. 2008; Pruss et al. 2010).

La population pédiatrique recensée par Shim et collaborateurs montre un EEG anormal dans 81% des cas ainsi qu'un LCR modifié chez presque 70% des patients avec une pléiocytose (Shim et al. 2020). Les imageries IRM se trouvent modifiées chez 53% des patients identifiant notamment une atrophie du parenchyme et un signal focal élevé. Dans une autre étude, les modifications du LCR, images IRM et EEG sont pathologiques dans le même ordre de grandeur (Wright, Hacoheh, et al. 2015).

### Anomalies du LCR

Dans l'EA à Ac anti-NMDAR il est retrouvé une composition biochimique et cellulaire anormale du LCR dans 80% des cas, et ce essentiellement au début de la pathologie. Pour les 20% restants, nombreux sont ceux dont le LCR deviendra anormal au cours de la maladie (Dalmau et al. 2011).

Dans les anomalies observées, une pléiocytose lymphocytaire peut être identifiée. Il s'agit d'une augmentation du taux de lymphocytes B et de plasmocytes identifiés par les marqueurs CD20 et CD138 respectivement. Ces plasmocytes dans le LCR sont responsables de la production d'Ac anti-NMDAR (Zheng et al. 2020).

La recherche d'immunoglobulines peut aussi passer par l'identification de bandes oligoclonales dans le LCR. Cette recherche se fait par une méthode d'isofocalisation et permet d'identifier un profil oligoclonal par séparation des Ig selon leurs points isoélectriques. Elle permet la révélation d'Ig présentes dans le LCR du patient. Ces bandes peuvent être observées lors d'une EA à auto Ac anti-NMDAR (Malter, Elger, et Surges 2013). La production au sein du SNC d'IgG peut être appréciée par la mesure de l'étanchéité de la barrière *via* l'index d'albumine et l'enrichissement en Ig (Gillain, Fumal, et Minon 2006; Luxton, McLean, et Edward J. 1990).

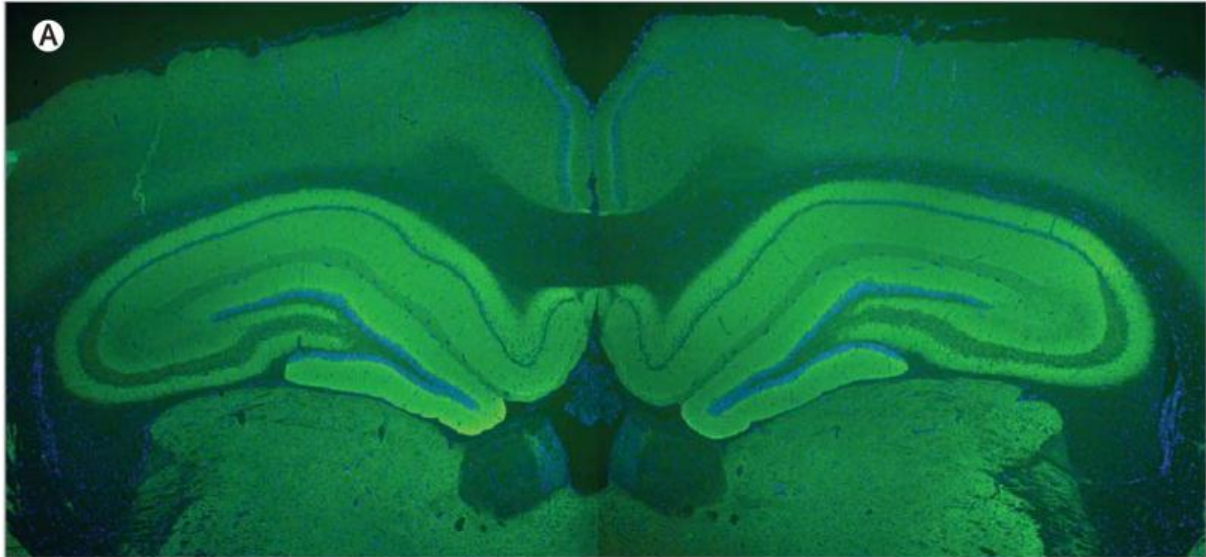
#### Recherche des Ac anti-NMDAR

Les symptômes de l'EA à Ac anti-NMDAR étant non spécifiques de la pathologie, le diagnostic va s'appuyer sur des analyses biologiques. Le diagnostic est établi par la détection d'Ac anti-NMDAR dans le LCR (B. Zhao et Nelson 2019). Il faut noter que dans l'EA à Ac anti-NMDAR, les Ac ne sont pas nécessairement retrouvés à la fois dans le LCR et dans le sérum d'un même patient. En effet, il arrive que ceux-ci ne soient pas identifiés dans le sérum malgré leur présence dans le LCR (Gresa-Arribas et al. 2014).

La méthode de détection est une méthode d'immunofluorescence. La révélation des Ac se fait à l'aide d'un autre Ac, dit Ac anti-humain secondaire, couplé à un fluorochrome qui permet la visualisation en microscopie. Cette étude doit se faire avant tout traitement.

Le LCR du patient est mis en contact avec des coupes histologiques de cerveau de rat (**Figure 19**) (Dalmau et al. 2008; Irani et al. 2010). La fixation d'Ac dans la zone

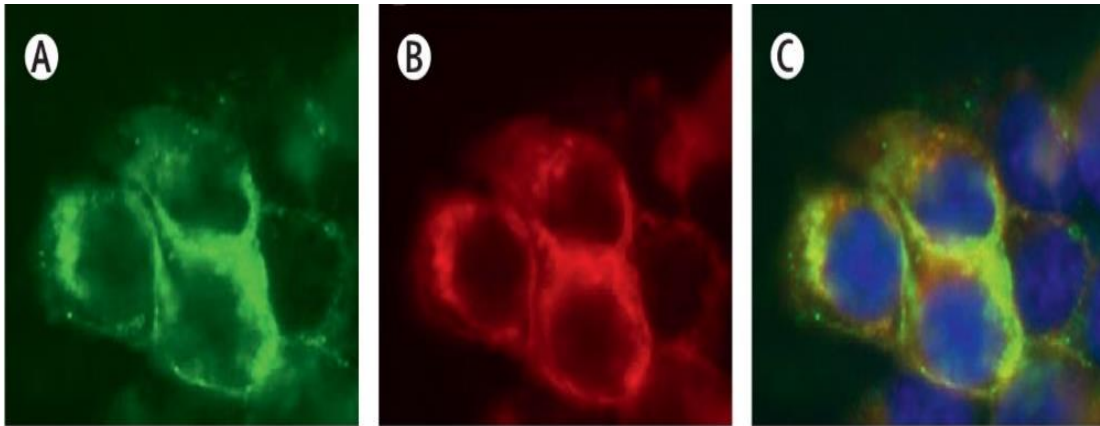
hippocampique est évocatrice car l'hippocampe de cerveau de rat est très riche en NMDAR.



**Figure 19** : Coupe histologique de cerveau de rat en présence de LCR de patient atteint d'une EA à Ac anti-NMDAR.

La zone hippocampique, particulièrement riche en NMDAR, est fortement reconnue par les Ac du patient (Dalmou et al. 2008).

La confirmation de la réactivité des Ac se fait à l'aide de cellules HEK transfectées avec le NMDAR. De la même façon que pour les coupes histologiques de cerveau de rat, le LCR des patients est mis en contact avec les cellules transfectées afin de révéler la présence d'Ac anti-NMDAR (Figure 20) (Dalmou et al. 2011; Irani et al. 2010).



**Figure 20** : Co-marquages de cellules HEK transfectées exprimant le NMDAR en présence de LCR de patient.

A, LCR de patient (dilution 1/40). B, Ac monoclonal dirigé contre la sous-unité GluN1 du NMDAR. C, colocalisation entre le LCR du patient et l'Ac monoclonal (Dalmau et al. 2011).

Une étude a pu montrer qu'une décroissance précoce et rapide des taux d'Ac dans le LCR était associée à une meilleure récupération de la maladie (Gresa-Arribas et al. 2014).

#### g. Prise en charge

Une stratégie thérapeutique a été proposée par l'équipe de Dalmau puis validée par l'expérience clinique du centre de référence des syndromes neurologiques paranéoplasiques de Lyon (Dalmau et al. 2011; Lamarque et al. 2011). Dans un premier temps, la présence d'une tumeur est recherchée, en particulier un tératome ovarien, comme déjà évoqué. Dans le cas où une tumeur est identifiée, la prise en charge commencera par la résection de celle-ci lorsque cela est possible. Puis les patients reçoivent une immunomodulation de première ligne qui permettra une nette amélioration des symptômes dans les semaines qui suivent pour 80% des patients

(Dalmau et al. 2011; Titulaer et al. 2013). Cette immunothérapie de première ligne est composée de corticostéroïdes tels que la méthyprednisolone, d'Ig et/ou une plasmaphérèse (Titulaer et al. 2013; Shin et al. 2018). Lorsqu'il n'y a pas de tumeur associée seuls 50% des patients présenteront une amélioration (Dalmau et al. 2011). Dans le cas où cette première ligne de traitement ne fonctionne pas, soit environ 30% des patients (Titulaer et al. 2013), les patients reçoivent les traitements de seconde ligne à base d'un Ac monoclonal, le rituximab. Celui-ci est dirigé contre les lymphocytes B et entraîne une déplétion de ceux-ci. Il peut être associé à du cyclophosphamide, un agent immunosuppresseur, souvent utilisé en cancérologie pour ses propriétés antiprolifératives (Titulaer et al. 2013; Ahlmann et Hempel 2016). Il est utilisé dans le traitement des EA en tant qu'agent antiprolifératif, ciblant la prolifération lymphocytaire T et B (Shin et al. 2018). Une minorité de patients reste cependant réfractaire à cette seconde ligne. Différentes molécules ciblant différentes voies de signalisation ont été proposées dont le tocilizumab (Dinoto, Ferrari, et Mariotto 2022). Cet Ac monoclonal permet de bloquer la transduction du signal de l'IL-6 (Mihara et al. 2005), cytokine impliquée dans la prolifération des lymphocytes B et dans la différenciation des lymphocytes Th17, et montre de meilleurs résultats dans l'efficacité du traitement lorsqu'il y est associé (W.-J. Lee et al. 2021).

75% des patients guériront ou présenteront des séquelles modérées (Dalmau et al. 2011). Les autres patients présenteront des séquelles plus importantes ou décèderont. Des rechutes sont possibles mais apparaissent moins sévères que la pathologie initiale. Parmi les patients qui rechutent, la fréquence est plus importante chez les patients ne présentant pas de tumeur associée à l'EA (Titulaer et al. 2013). Dans la population pédiatrique, la précocité du diagnostic est associée à une meilleure récupération qui est sans séquelles dans 78% des cas (Wright, Hacoheh, et al. 2015).

A l'inverse, lors d'un diagnostic tardif seul 14% des patients récupéreront totalement et 72% auront une récupération partielle. Dans chaque cas, la récupération sera longue et des séquelles pourront persister entraînant des difficultés à la réintégration sociale (Venkatesan 2015).

**Pour résumer :**

- Les maladies autoimmunes correspondent à une rupture des mécanismes de tolérance immunitaire, c'est-à-dire un dysfonctionnement de la capacité à ne pas répondre au « soi ».
- Les encéphalites sont des pathologies résultant d'une inflammation du SNC. Les étiologies de cette maladie peuvent être infectieuses, dysimmunitaires ou non identifiées.
- Ces Ac se fixent au niveau du domaine ATD de la sous-unité gluN1 entraînant une internalisation des NMDAR.
- Parmi les encéphalites à causes immunologiques se trouve l'EA à Ac anti-NMDAR dont l'étiologie peut être liée à un tératome ovarien, une infection HSV ou bien inconnue. Cette pathologie touche principalement la femme jeune.
- Les manifestations cliniques sont non spécifiques avec des troubles de type psychiatrique évoquant une schizophrénie.
- Le diagnostic repose sur l'identification d'Ac anti-NMDAR dans le LCR.
- Le traitement impose la résection de la tumeur lorsqu'elle est présente et que cela est possible. Le traitement est une immunothérapie qui associe à une corticothérapie, des Ig et plasmaphérèse. En deuxième ligne du rituximab et cyclophosphamide sont proposés.
- Sans traitement la maladie peut aboutir au décès du patient. La récupération est longue et des séquelles peuvent perdurer altérant significativement la qualité de vie.

## 4. Les modèles murins d'encéphalite autoimmune à anticorps anti-NMDAR

Plusieurs modèles pré-cliniques ont été développés ces dernières années permettant une étude des effets des Ac anti-NMDAR et une meilleure compréhension de leur rôle dans cette pathologie.

Ces modèles peuvent être distingués en deux grands types. Le premier type de modèle passe par une immunisation active où un peptide, ou bien une protéine, dérivés du NMDAR est administré à une souris en présence ou non d'adjuvants. Le second type consiste en l'injection d'Ac anti-NMDAR déjà produits par un organisme donneur (humain ou murin) à un organisme receveur. Il s'agit d'un modèle de transfert passif. Le modèle utilisé pour notre étude fait partie de la première catégorie.

### a. Les modèles par immunisation active

Les modèles par immunisation active consistent à administrer l'Ag contre lequel une réponse immunitaire est souhaitée. Cet Ag est généralement associé à des adjuvants stimulant l'immunité innée et permettant le développement de la réponse autoimmune.

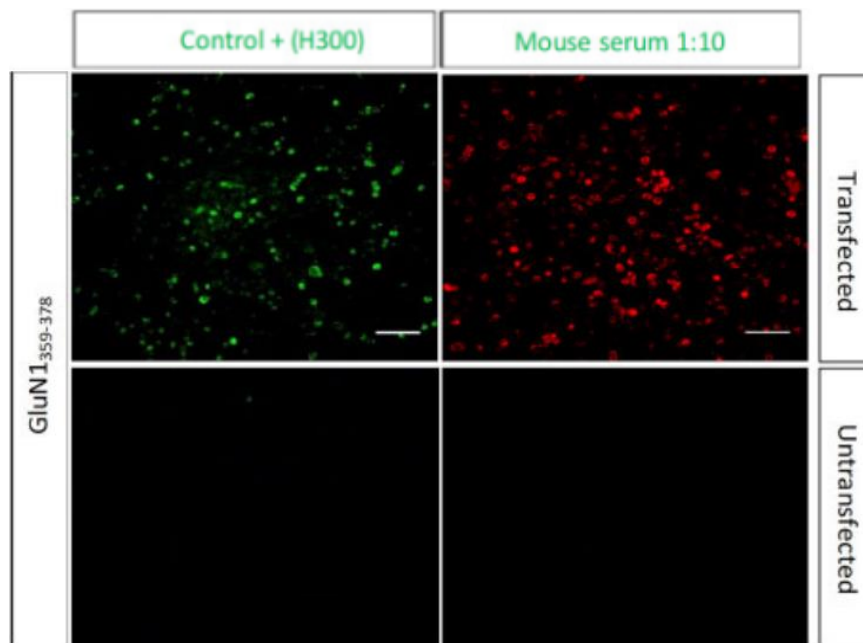
#### Modèle de Wagnon et collaborateurs

Ce modèle a été mis en place au sein de notre laboratoire et est celui qui a été utilisé pour notre étude (Wagnon et al. 2020). L'immunisation consiste en l'injection sous-cutanée (s.c.) d'un peptide, constitué de 20 acides aminés, issu de la sous-unité GluN1 du NMDAR. Comme dans le modèle EAE, le peptide (GluN1<sub>359-378</sub>) est



émulsionné dans de l'adjuvant complet de Freund (CFA), supplémenté avec *Mycobacterium tuberculosis*. De la toxine pertussique est injectée en intra-péritonéale (i.p.) le jour de l'immunisation puis est renouvelée à 48h. Les analyses biologiques sur le modèle et tests comportementaux ont été réalisés deux semaines suivant l'immunisation.

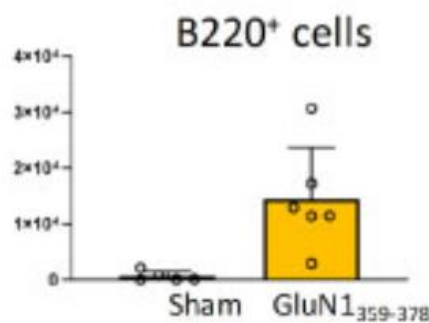
La production d'Ig spécifique a été évaluée par utilisation de cellules HEK transfectées pour exprimer les sous-unités GluN1 et GluN2B. Les sera des souris immunisées ont été incubés sur des cellules HEK transfectées ou non, mettant en évidence la production d'Ig spécifiques de la sous-unité GluN1 du NMDAR dans ce modèle (**Figure 21**).



**Figure 21** : Production d'Ig spécifiques de GluN1 dans un modèle d'EA à Ac anti-NMDAR.

Immunomarquage de cellules HEK transfectées ou non pour exprimer les sous-unités GluN1 et GluN2B du NMDAR. Les cellules ont été incubées avec le sérum issu des souris immunisées avec le peptide GluN1, après deux semaines. Un Ac commercial anti-GluN1, H300, a été utilisé comme contrôle positif (Adapté de [Wagnon et al. 2020](#)).

L'étude de l'influx du  $\text{Ca}^{2+}$ , *in vitro*, a montré que lorsque des neurones étaient incubés en présence de sérum de souris immunisées, la réponse à la stimulation au NMDA est nettement diminuée. De plus, un nombre plus important de lymphocytes B (identifiés par le marqueur B220) a été retrouvé dans le cerveau des animaux immunisés par rapport à leur contrôle (**Figure 22**). A l'inverse, une déplétion des lymphocytes B, une semaine en amont de l'immunisation, permet de prévenir les troubles comportementaux observés. Ce résultat met en évidence l'implication des lymphocytes B dans ce modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR.

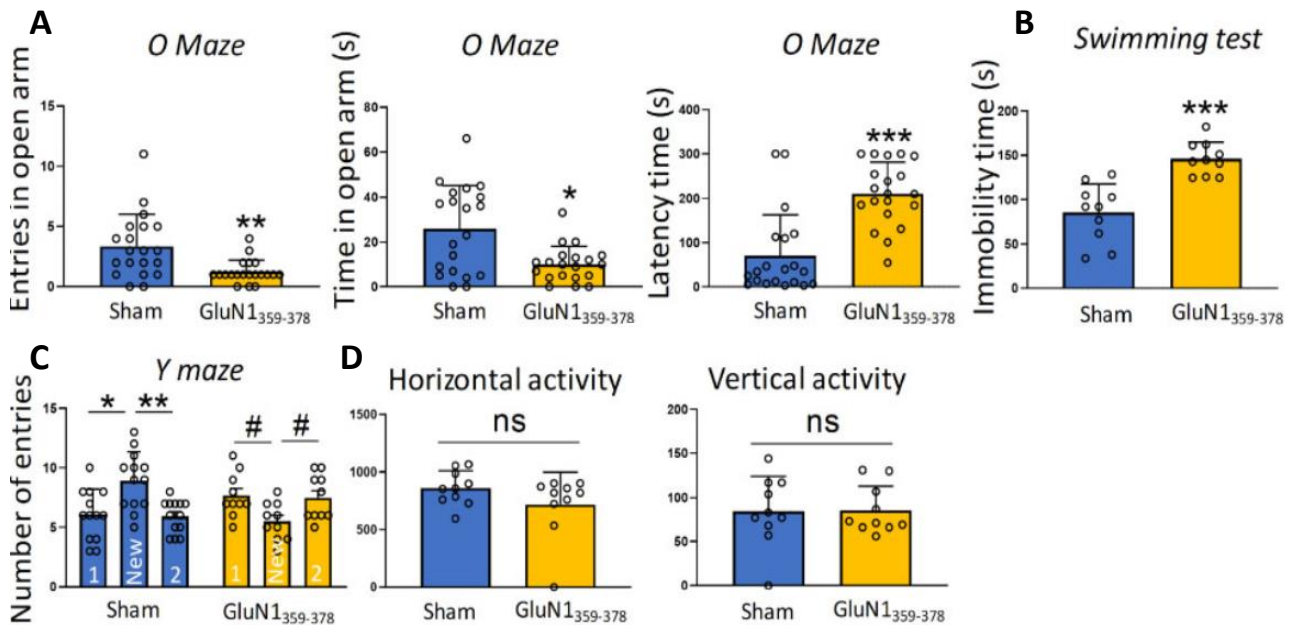


**Figure 22 : Infiltration de lymphocytes B dans le SNC dans le modèle d'EA à Ac anti-NMDAR.**

Les lymphocytes B activés, exprimant le marqueur B220, ont été quantifiés dans le cerveau de souris immunisées avec le peptide GluN1 vs leur contrôle, deux semaines après l'immunisation. n=5 et 6 respectivement (Wagnon *et al.* 2020).

Les tests comportementaux ont été réalisés deux semaines après immunisation. Le test du O-maze, mesurant l'anxiété, montre une diminution des entrées et le temps passé dans le bras ouvert est significativement diminué par rapport aux animaux contrôles. Le temps de latence de la sortie du bras fermé est lui significativement augmenté (**Figure 23A**). Le test de la nage forcée, évaluant le comportement dépressif, montre par mesure du temps d'immobilité un comportement

dépressif chez les animaux immunisés (**Figure 23B**). Le test du Y-maze montre une absence d'exploration préférentielle du nouveau bras lors de la phase de rappel, évoquant un trouble de la mémorisation (**Figure 23C**). L'activité motrice, mesurée par un test d'actimétrie, ne montre pas de différence entre les deux groupes (**Figure 23D**). Pour résumer, dans ce modèle, des troubles comportementaux de type anxieux et dépressifs ont été mis en évidence, ainsi qu'un trouble de mémorisation.

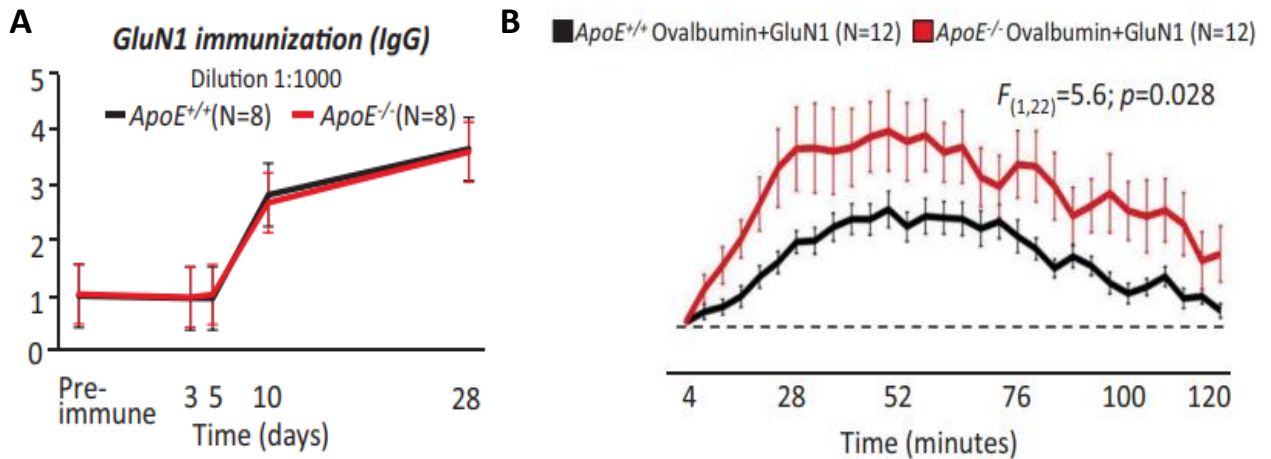


**Figure 23** : L'immunisation avec le peptide GluN1 induit un comportement anxieux et dépressif, associé à un trouble de mémorisation.

Les tests comportementaux ont été réalisés deux semaines après l'immunisation avec le peptide GluN1. A, Nombre d'entrées dans le bras ouvert, temps passé dans le bras ouvert, temps de latence à la sortie du bras fermé (n=10 et 12 respectivement). B, Temps d'immobilité lors de la nage forcée (n=10). C, Nombre d'entrées dans chaque bras lors de la phase de rappel (n=12). D, Mesure de l'activité horizontale et verticale par le test de l'actimétrie (n=10). ns, non significatif, \* ou # p<0,05, \*\*p<0,01, \*\*\*p<0,001 (Wagnon et al. 2020).

### Modèle de Pan et collaborateurs

Dans ce modèle, les auteurs ont immunisé les animaux selon un protocole classique d'immunisation (Pan et al. 2019). Les animaux utilisés sont génétiquement modifiés pour ne pas exprimer le gène *ApoE*, ce qui conduit à une altération de la BHE (Methia et al. 2001). Quatre peptides issus du domaine extracellulaire de la sous-unité GluN1 du NMDAR ont été injectés en s.c. simultanément à du CFA. Dans les dix jours suivant l'immunisation, une production d'IgG spécifiques des peptides est observée, sans différence entre les animaux *ApoE*<sup>-/-</sup> et les « wild-type » (contrôle) (Figure 24A). Le test d'anxiété (open-field) réalisé deux semaines après l'immunisation ne met pas en évidence de comportement anormal des animaux immunisés par rapport à leur contrôle. Cependant, l'utilisation de MK-801, inhibiteur non compétitif du NMDAR, quatre semaines suivant l'immunisation met en évidence une hyperactivité, dans le test de l'open-field, des animaux dont la BHE n'est pas intègre (*ApoE*<sup>-/-</sup>) (Figure 24B).



**Figure 24 : Effets biologiques et comportementaux des IgG anti-NMDAR d'un modèle murin présentant une altération de la BHE.**

Les résultats sont présentés par rapport à la ligne de base mesurée 8 jours avant immunisation avec les peptides issus de la sous-unité GluN1 du NMDAR. A, Délai d'apparition d'IgG spécifiques du NMDAR dans le sérum des animaux après immunisation. B, Mesure de l'activité en open-field suite à l'injection de l'inhibiteur non compétitif du NMDAR, MK-801. (Adapté de [Pan et al. 2019](#)).

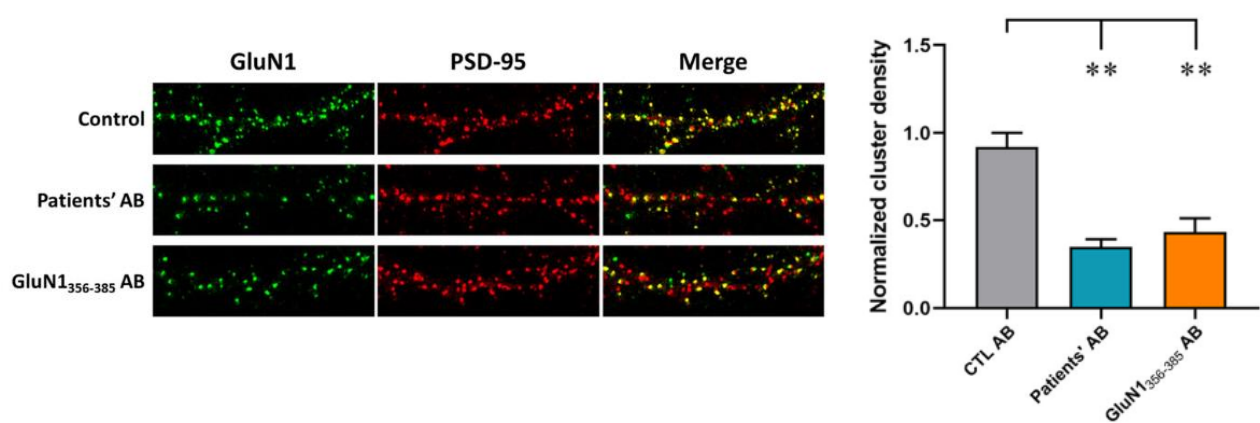
Ce modèle montre que l'immunisation avec des peptides GluN1 induit la production d'Ac anti-NMDAR. L'apparition des symptômes comportementaux nécessite l'ouverture de la BHE. Cependant, la contribution des Ac anti-NMDAR dans ce modèle est difficile à caractériser, due à la présence de MK-801 qui bloque le NMDAR.

#### Modèle de Ding et collaborateurs

Ce modèle suit un protocole d'immunisation similaire aux modèles précédents de Pan et Wagnon ([Ding et al. 2021](#)). Le peptide, de 30 acides aminés, issu de la sous-unité GluN1<sub>356-385</sub> est administré par voie s.c. émulsionné dans du CFA supplémenté avec *Mycobacterium tuberculosis*. Il est à noter que la séquence du peptide utilisé dans notre modèle est incluse dans le peptide présenté ici. Une injection i.p. de toxine

pertussique est réalisée le jour de l'immunisation ainsi que 48h plus tard. Un « boost » de l'immunisation est effectué à 4 et à 8 semaines suivant la première immunisation et les tests comportementaux à 12 semaines.

Il a été mis en évidence une diminution de la densité des NMDAR *in vitro* à la surface de neurones de souris en culture primaire suite à une incubation de 24h avec le LCR de patients ou de souris (**Figure 25**).

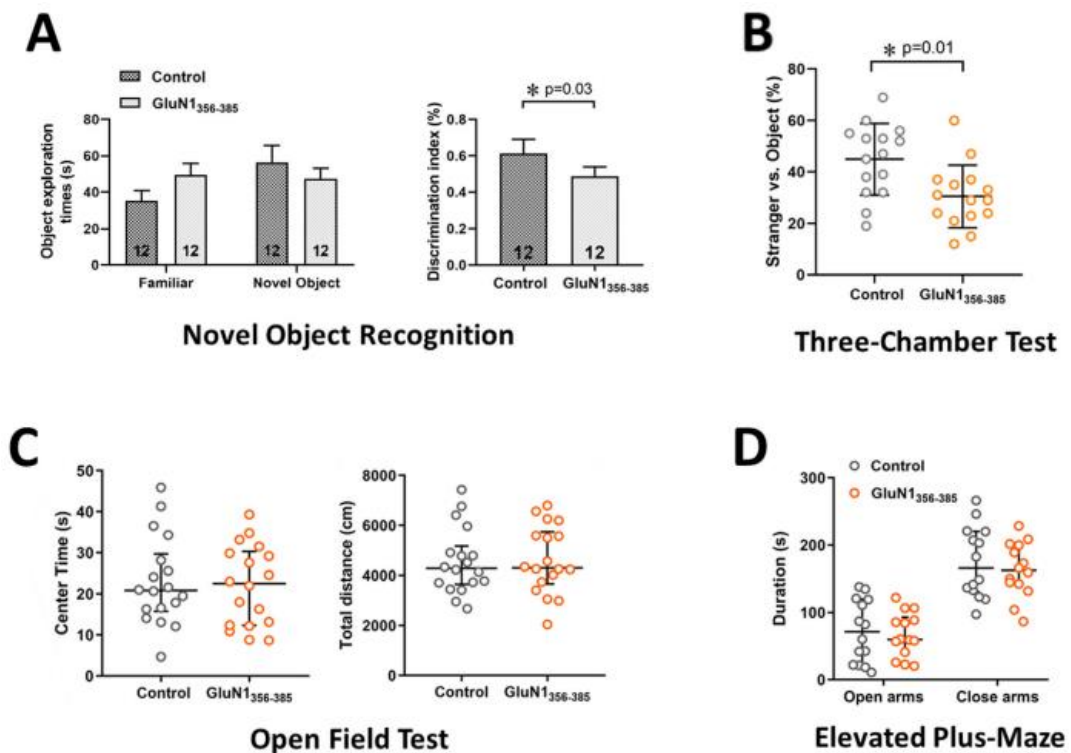


**Figure 25 : Effet des Ac issus de LCR de patients ou de souris immunisées sur la densité d'expression des NMDAR.**

Des neurones en culture primaire ont été incubés pendant 24h avec du LCR de patients et de souris immunisées avec le peptide GluN1<sub>356-385</sub>. Des Ac commerciaux dirigés contre la sous-unité GluN1 et le PSD-95, un marqueur post-synaptique, ont été utilisés (Adapté de [Ding et al. 2021](#)).

Des tests comportementaux ont été effectués (**Figure 26**) : le test de la reconnaissance du nouvel objet montre une absence de discrimination de celui-ci, suggérant un trouble de la mémorisation qui peut être retrouvé chez les patients ([Dalmau 2016](#)). L'absence de discrimination se vérifie également avec le three-chamber test. Ce test permet d'évaluer le comportement social des animaux en mesurant leur préférence à un congénère vs un objet, ou leur préférence à un nouvel

individu vs un individu familier. Cependant, les tests mesurant l'activité et l'anxiété que sont le test de l'open-field et l'elevated plus-maze ne montrent pas de différence entre les animaux contrôle et les animaux immunisés.



**Figure 26 : Phénotype comportemental dans un modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR.**

Les tests ont été réalisés 12 semaines après l'immunisation avec le peptide GluN1. A, Test de reconnaissance du nouvel objet, l'exploration de l'objet familier vs le nouvel objet est mesurée par le temps passé dans le dispositif et l'index de discrimination. B, Three-chamber test, préférence au nouveau congénère vs l'objet. C, Test de l'open-field, mesure du temps passé au centre du dispositif et la distance parcourue. D, Test de l'elevated plus-maze, mesure du temps passé dans les bras ouverts et les bras fermés (Ding et al. 2021).

Ce modèle met en évidence à la surface des neurones, en présence d'Ac spécifiques, une diminution de la densité des NMDAR. Ceci est aussi observé avec du

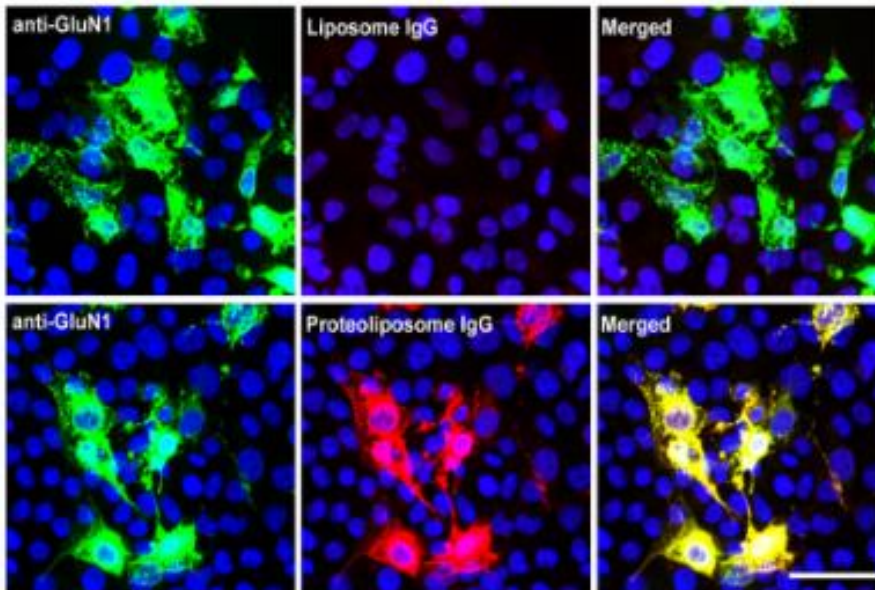
LCR de patient, ce qui renforce l'intérêt du modèle. De plus, les tests comportementaux indiquent des troubles de mémorisation, symptôme également retrouvé chez les patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR.

### Modèle de Jones et collaborateurs

Ce modèle est réalisé *via* une immunisation active mais à la différence des modèles précédents, l'Ag n'est pas un peptide de la sous-unité GluN1. Il est sous la forme de protéines GluN1 et GluN2, conformées en récepteur tétramérique et intégrées à des liposomes (Jones *et al.* 2019). Ce complexe liposome/récepteur est appelé protéoliposome. Un « *boost* » de l'immunisation est réalisé deux semaines plus tard et les tests comportementaux ont été réalisés 35 jours après la première immunisation.

Une production d'Ac spécifiques de GluN1, dans le sérum des animaux immunisés, a été mise en évidence *in vitro* par l'utilisation de cellules HEK transfectées pour exprimer les sous unités GluN1 et GluN2A du NMDAR, six semaines après l'immunisation (**Figure 27**). Ces Ac peuvent être à l'origine d'une hypofonction de l'activité des NMDAR, cependant, à l'inverse de ce qui a déjà été montré dans d'autres modèles (Ding *et al.* 2021; Malviya *et al.* 2017), ceux-ci n'impactent pas la densité des NMDAR sur les neurones.

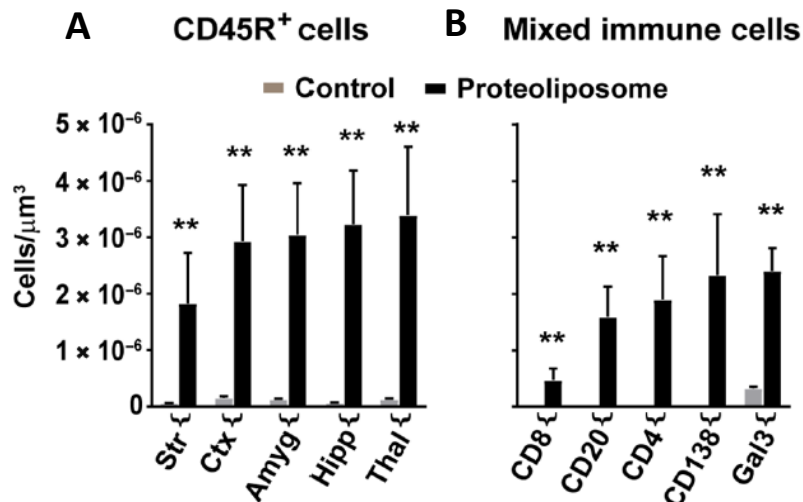




**Figure 27** : Détection d'IgG anti-NMDAR dans un modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR.

Le sérum des animaux, extrait six semaines après immunisation avec les liposomes ou protéoliposomes (récepteur tétramérique des sous-unités GluN1 et GluN2 intégré à des liposomes), a été mis en contact avec des cellules HEK exprimant la sous unité GluN1 et GluN2A du NMDAR (rouge). Un Ac commercial anti-GluN1 a été incubé simultanément (vert) (Jones et al. 2019).

De plus, à ce même temps, il a été observé une infiltration des cellules immunitaires au sein des différentes structures du SNC (**Figure 28**). Les leucocytes, identifiés par le marqueur CD45, sont présent à la fois dans le striatum, le cortex, l'amygdale, l'hippocampe et le thalamus (**Figure 28A**). Parmi ces leucocytes, plusieurs types cellulaires ont été mis en évidence : les lymphocytes T via les marqueurs CD4 et CD8, les lymphocytes B et plasmocytes *via* les marqueurs CD20 et CD138 respectivement, et les macrophages et microglie via le marqueur Galactine 3 (**Figure 28B**).

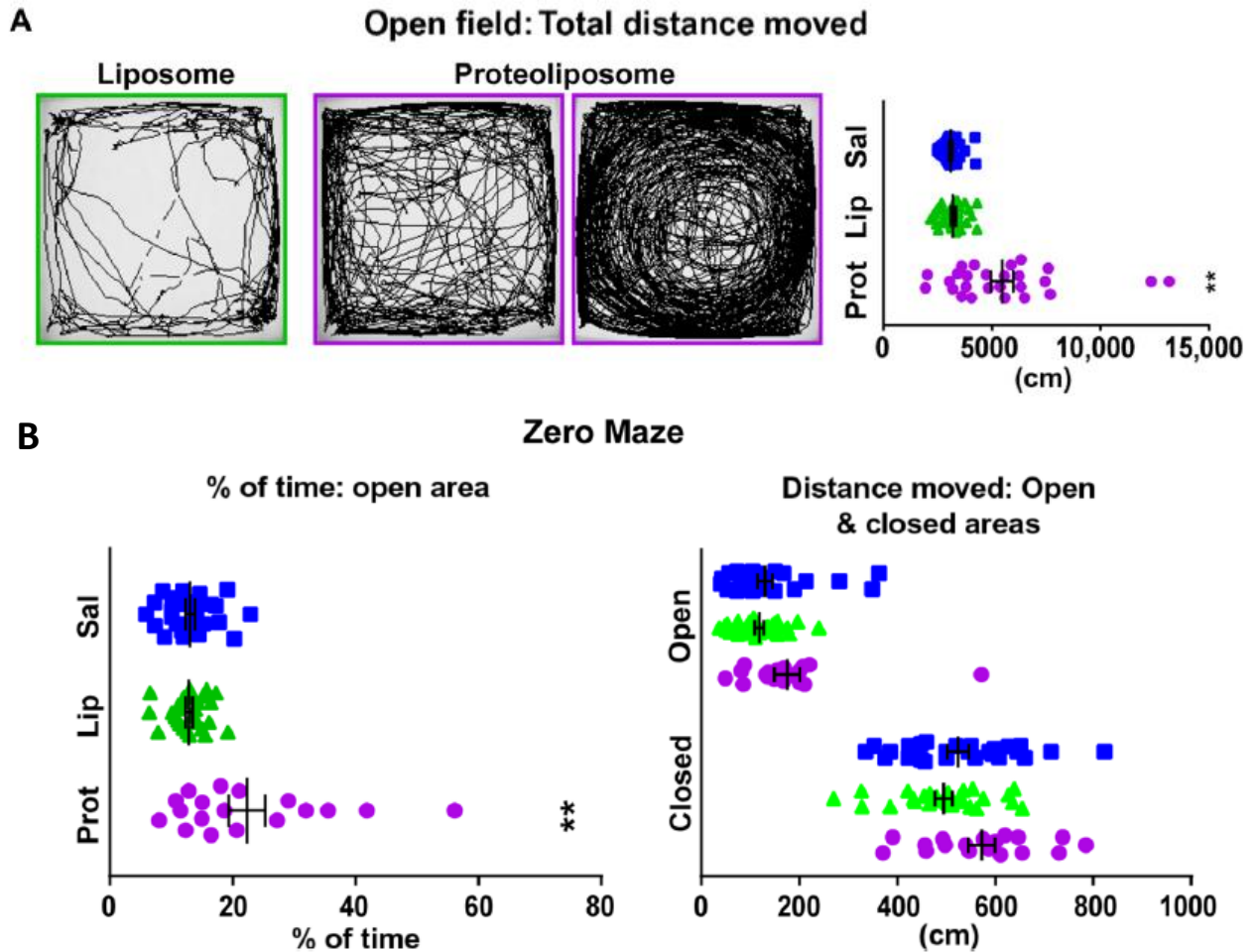


**Figure 28** : Infiltration de cellules immunitaires dans le SNC dans un modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR.

Six semaines après immunisation avec des liposomes ou protéoliposomes (récepteur tétramérique des sous-unités GluN1 et GluN2 intégré à des liposomes), les structures du cerveau des animaux ont été prélevées. A, Identification de l'infiltration leucocytaire dans les structures du SNC, le striatum (str), le cortex (ctx), l'amygdale (amyg), l'hippocampe (hipp) et le thalamus (thal). Les leucocytes sont reconnus par l'expression du marqueur CD45. B, Caractérisation du type cellulaire des cellules infiltrées. Les lymphocytes T sont identifiés par les marqueurs CD4 et CD8, les lymphocytes B par le CD20 et les plasmocytes par le CD138, les macrophages et microglie par la galactine 3 (gal3). n=6 \*\*p=0,0022 (Jones et al. 2019).

Des tests comportementaux ont été réalisés 35 jours après la première immunisation. Le test de l'open-field montre une hyperactivité des souris traitées avec les protéoliposomes (**Figure 29A**) avec une variabilité au sein de ce groupe. Malgré cette variabilité, l'activité reste tout de même supérieure aux souris contrôles ayant reçu des liposomes. La mesure de l'anxiété, réalisée par le test du O-maze (zero maze), ne montre pas de différence dans la distance parcourue au sein des zones ouvertes et fermées (**Figure 29B**). Une différence est cependant observée dans le pourcentage de temps passé dans la zone ouverte, habituellement anxiogène. En

effet, les animaux traités y passent significativement plus de temps que les animaux contrôles.



**Figure 29** : Phénotype comportemental d'un modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR.

Les souris ont été immunisées avec des liposomes ou protéoliposomes (récepteur tétramérique des sous-unités GluN1 et GluN2 intégré à des liposomes) et leur comportement a été évalué 35 jours après. A, Distance parcourue dans l'open field pour les souris contrôles (liposome) et les souris traitées (protéoliposomes). La distance totale est évaluée en cm. B, Evaluation du pourcentage de temps passé dans les bras ouverts du O-maze. Distance parcourue en cm dans les bras ouverts et fermés respectivement. n=26 protéoliposomes, n=28 liposomes et salines, \*\*p<0,0001. (Jones *et al.* 2019).

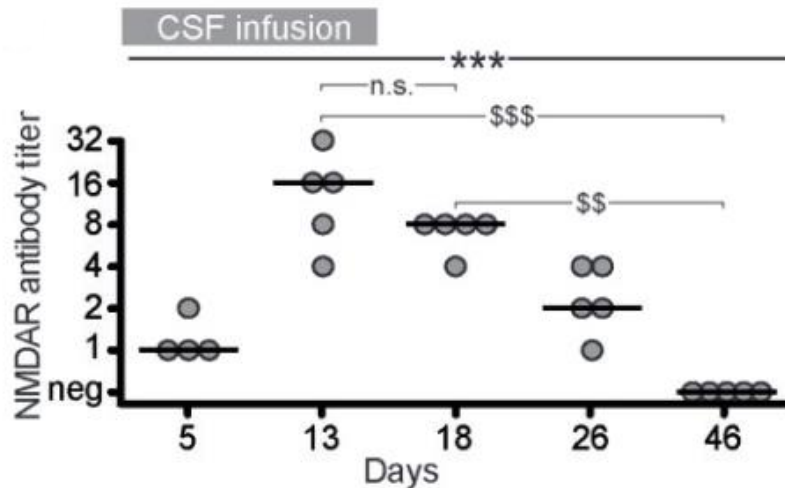
Ce modèle présente des similitudes avec ce qui est observé chez les patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR. Le phénotype comportemental chez les souris immunisées présente des similitudes avec les troubles observés chez ces patients (Graus *et al.* 2016).

### b. Les modèles de transfert passif d'anticorps

Ces modèles consistent en l'injection des Ac pathogènes directement dans le SNC. Il n'y a pas ici de production endogène des Ac. Cette méthode est qualifiée d'immunité passive et permet l'étude des effets des Ac anti-NMDAR.

#### Modèle de Planagumà et collaborateurs

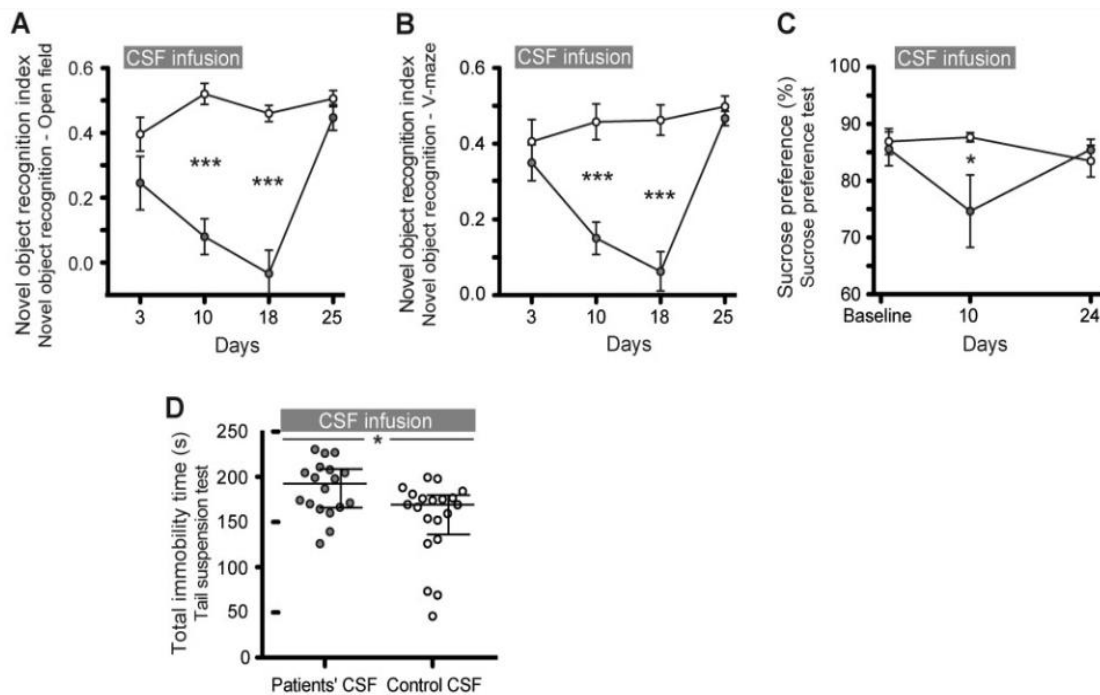
Ce modèle repose sur l'injection continue de LCR de patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR sur une durée de 14 jours (Planagumà *et al.* 2015). Le LCR est délivré par une pompe osmotique directement dans la zone cérébroventriculaire. Les Ac anti-NMDAR ont été mis en évidence au niveau de l'hippocampe après leur extraction et leur quantification par immunoblot. Cette quantification a été réalisée à différents temps, pendant ou après l'injection du LCR (**Figure 30**). Le dosage montre une augmentation jusqu'à 13 jours après le début de l'injection puis une diminution. Les Ac ne sont plus détectables à 46 jours.



**Figure 30** : Quantification des Ac anti-NMDAR dans l'hippocampe des animaux immunisés par transfert passif de LCR de patient.

Le LCR de patients a été injecté pendant 14 jours dans le SNC de souris. Le taux d'Ac anti-NMDAR a été mesuré dans l'hippocampe à différents temps, pendant et après l'injection.  $n=5$  et  $n=4$  pour le jour 5 ; ns, non significatif ; \$\$  $p < 0,01$  ; \$\$\$ ou \*\*\*  $p < 0,001$ . (Planagumà et al. 2015).

Afin d'évaluer l'effet de ces Ac sur l'apparition de troubles comportementaux, des tests ont été réalisés pendant et après l'injection du LCR. Les animaux recevant le LCR de patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR ne présentent pas d'agressivité, d'anxiété ou une locomotion modifiée par rapport à ceux ayant reçu le LCR de patients contrôles. En revanche, des troubles de mémorisation ont été relevés à partir du 10<sup>e</sup> jour d'injection jusqu'à au moins le 18<sup>e</sup> jour, soit 4 jours après l'arrêt de l'infusion (**Figure 31A-B**). De plus, un comportement dépressif a été mis en évidence au 10<sup>e</sup> jour par le test de préférence au sucrose et au 12<sup>e</sup> jour par le test de suspension par la queue (**Figure 31C-D**). A noter, qu'après un laps de temps d'environ 10 jours après l'arrêt de l'injection de LCR, les animaux retrouvent un comportement normal, suggérant un effet transitoire des Ac anti-NMDAR et permettant ainsi la récupération.



**Figure 31** : Effet sur le comportement murin de l'injection de LCR de patients contenant des Ac anti-NMDAR.

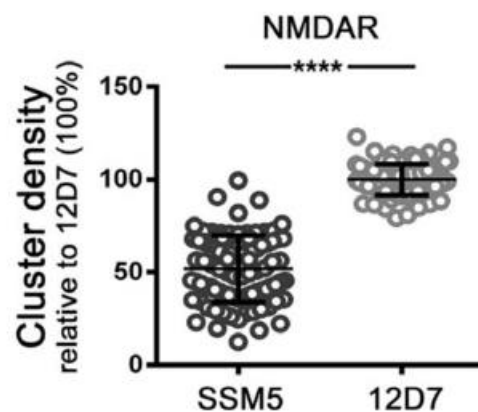
A,B, Tests de la reconnaissance du nouvel objet en open-field ou Y-maze pendant et après l'injection de LCR. Les index les plus élevés signifient une meilleure discrimination du nouvel objet. C, Test de la préférence au sucrose. Une diminution de la préférence de l'eau sucrée signifie une anhédonie. D, Temps d'immobilisation après suspension par la queue au 12<sup>e</sup> jour, soit pendant la période d'injection. Ronds gris : LCR de patients, ronds blancs : LCR contrôles. n=18 pour les LCR de patients (excepté open field n=8), n=20 pour le LCR contrôles (excepté open-field n=10) ; \*p<0,05 ; \*\*\*p<0,001 (Adapté de [Planagumà et al. 2015](#)).

### Modèle de Malviya et collaborateurs

Ce modèle de transfert passif consiste en l'injection d'un Ac monoclonal humain anti-NMDAR préalablement sélectionné ([Malviya et al. 2017](#)). Les plasmocytes présents dans le LCR de patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR ont été isolés et une analyse des chaînes légères des Ig a été effectuée par « single cell séquençage ». Les transcrits ont été amplifiés par RT-PCR et l'Ac le plus affin a été sélectionné.

L'injection se déroule de la même manière que le modèle précédent, Planagumà et collaborateurs, et se déroule également sur 14 jours.

L'injection de cet Ac monoclonal, identifié SSM5 vs 12D7 pour son contrôle, met en évidence une diminution de près de 50% de la densité des NMDAR au sein de l'hippocampe au 18<sup>e</sup> jour, soit 4 jours après la fin de l'infusion de l'Ac (**Figure 32**).



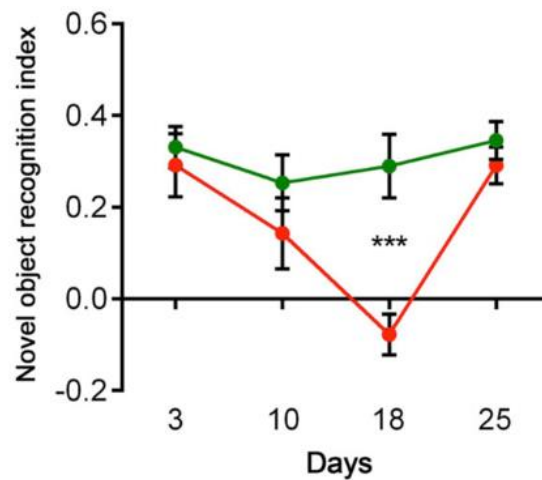
**Figure 32** : Densité des NMDAR dans l'hippocampe de souris injectées avec un Ac monoclonal anti-NMDAR.

Les souris sont injectées avec un Ac monoclonal humain anti-NMDAR. Au 18<sup>e</sup> jour après le début de l'injection, qui a duré 14 jours, la densité des NMDAR sur l'ensemble des structures de l'hippocampe a été mesurée. SSM5 : Ac monoclonal ; 12D7 : Ac contrôle. n=5 (avec 18 aires hippocampiques par animal). \*\*\*\*p<0,0001 (Adapté de [Planagumà et al. 2015](#)).

Le test comportemental effectué est la reconnaissance du nouvel objet, permettant de mettre en évidence un déficit de mémorisation. Ce test a été choisi en lien avec la validation du modèle précédent ([Planagumà et al. 2015](#)). Celui-ci est réalisé pendant et après l'injection de l'Ac monoclonal en intracérébral et montre une discrimination du nouvel objet décroissante pendant l'injection avec un pic au 18<sup>e</sup> jour, soit 4 jours après la fin du protocole d'infusion (**Figure 33**). La semaine suivante, ce



déficit de mémorisation est reversé. Ces données sont en adéquation avec le modèle de Planagumà et collaborateurs.



**Figure 33 : Effet de l'Ac monoclonal humain anti-NMDAR sur la mémorisation des souris.**

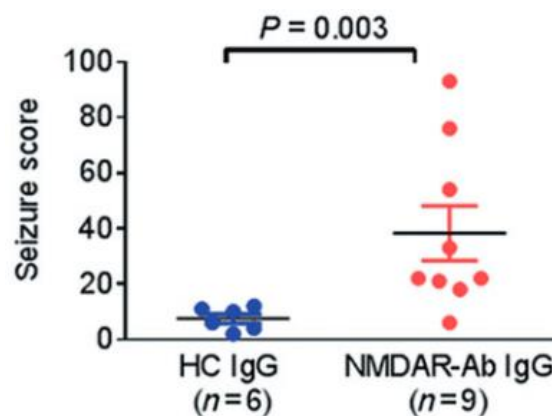
Le test de la reconnaissance du nouvel objet est effectué pendant et après l'injection de l'Ac monoclonal humain anti-NMDAR dans le cerveau de souris (fin de l'injection au 14<sup>e</sup> jour). Un index élevé est synonyme d'une meilleure discrimination du nouvel objet. n=7, rouge : Ac monoclonal anti-NMDAR, vert : Ac contrôle 12D7, \*\*\*p<0,001. (Planagumà et al. 2015).

### Modèle de Wright et collaborateurs

Ce modèle de transfert passif a été développé afin d'étudier les crises d'épilepsie pouvant survenir chez les patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR (Dalmau et al. 2008). Il consiste en la pose d'un système d'EEG sans fil, à base d'électrodes implantées dans le cerveau, suivie à 7 et 14 jours de l'injection d'IgG purifiées de patients dans le ventricule cérébral gauche (Wright, Hashemi, et al. 2015). Des analyses par immunohistofluorescence ont montré que les IgG injectées se fixaient au niveau de l'hippocampe.



Les crises d'épilepsie sont induites par l'injection de pentylenetetrazol (PTZ). Le PTZ est administré en i.p. 48h après la première administration des IgG, soit 9 jours après la pose du transmetteur. Les crises d'épilepsie qui en découlent sont enregistrées pendant 60 minutes. L'analyse du score moyen des crises montre un score plus élevé chez les souris ayant reçu les IgG de patient par rapport aux souris contrôles (**Figure 34**).



**Figure 34** : Effet de l'injection d'IgG de patients sur les crises d'épilepsies chez les souris.

Le PTZ est administré à des souris 9 jours après la pose du transmetteur d'EEG et 48h après l'injection des IgG de patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR. Les crises qui surviennent sont évaluées durant 60 min. HC, contrôle sain. (Adapté de [Wright et al. 2015](#)).

Qu'il s'agisse de modèles d'immunisation active ou de transfert passif, les modèles murins permettent une meilleure compréhension de la pathologie et des mécanismes sous-jacents. Une des causes possibles de l'EA à Ac anti-NMDAR est une infection à HSV ([Dalmau, Geis, et Graus 2017](#)). Aussi, l'équipe de Linnoila et collaborateurs ont développé un modèle d'EA à Ac anti-NMDAR post-infection à HSV ([Linnoila et al. 2019](#)). Les animaux sont inoculés par voie intranasale et traités par

acyclovir, un antiviral, pendant 2 semaines. Il est reporté que près de 70% des animaux développent des Ac dirigés contre la sous-unité GluN1 du NMDAR. Ce modèle ouvre de nouvelles perspectives en se rapprochant de la clinique chez les patients.

**Pour résumer :**

- Les modèles murins permettent l'étude du rôle des Ac anti-NMDAR dans la pathologie.
- Les modèles sont réalisés par immunisation active ou par transfert passif d'Ac. Notre modèle fait partie de la première catégorie.
- Dans notre modèle il a été mis en évidence la production d'Ac spécifiques ainsi que l'infiltration de lymphocytes B dans le SNC. Un comportement anxieux et dépressif, associés à un trouble de la mémorisation ont été observés.

## 5. Les nanoparticules dans les stratégies d'immunothérapie tolérogène

Pour rappel, le traitement de l'EA à Ac anti-NMDAR est composé des thérapies de 1<sup>ère</sup> ligne à base de corticostéroïdes, Ig et plasmaphérèse. Les patients réfractaires à ces traitements de 1<sup>ère</sup> intention bénéficient de rituximab et cyclophosphamide en seconde ligne (Titulaer et al. 2013). Paracelse, un médecin alchimiste du 16<sup>e</sup> siècle, est à l'origine de la phrase suivante : « Tout est poison, rien n'est poison, cela dépend de la dose ». Cette citation illustre bien dans notre cas l'efficacité des traitements employés mais également les effets secondaires et la toxicité dont ils peuvent être responsables. C'est le cas notamment du rituximab dont les effets indésirables sont multiples et variés, tels que infectieux ou cardiovasculaires (Bejan-Angoulvant et Alexandre 2019). Le cyclophosphamide est quant à lui responsable de toxicité rénale. De façon plus générale, l'ensemble des traitements utilisés dans l'EA à Ac anti-NMDAR sont à l'origine d'une diminution de l'immunité, pouvant conduire à l'apparition d'infections opportunistes ou de réactivation virale. La diminution de l'immunité peut être attribuée au mécanisme d'action des traitements qui amenuisent la population d'acteurs de l'immunité. L'induction d'une immunothérapie tolérogène pour les pathologies autoimmunes est depuis longtemps à l'étude (Link et al. 2001; Bluestone et Tang 2004) afin de s'affranchir des effets secondaires et de la toxicité des traitements conventionnels actuels. L'émergence de l'utilisation de nanotechnologies, et plus précisément de nanoparticules (NP), dans ce domaine ouvre de nouvelles perspectives préventives et curatives (Mitarotonda et al. 2022). L'utilisation de NP offre de nombreux avantages tant sur leur formulation, leurs propriétés et leurs capacités à impacter différents acteurs de l'immunité tels que les lymphocytes T ou B régulateurs (Ahmad, Al-Hatamleh, et Mohamud 2021).

### a. Les immunothérapies tolérogènes

L'objectif d'une immunothérapie tolérogène est de rétablir la tolérance envers un Ag tout en gardant la capacité de répondre aux infections. L'immunothérapie spécifique d'un Ag est un concept bien connu de nos jours dans le domaine biomédical, son utilisation remonte à de nombreuses décennies et est utilisée depuis plus d'un siècle dans le traitement des allergies (Noon 1911). De nombreuses stratégies ont été à l'étude pour l'induction d'une immunothérapie tolérogène. Parmi ces stratégies nous pouvons citer celle des cellules dendritiques tolérogéniques. Par exemple, parmi de nombreuses études l'une d'entre elles fait état de cellules dendritiques de patients atteints de polyarthrite rhumatoïde ou de donneurs sains qui sont isolées et cultivées *in vitro* (Harry et al. 2010). Leur différenciation en cellules dendritiques tolérogènes est établit après traitement par cGMP-grade (clinical grade granulocyte macrophage colony stimulating factor) et MPLA (monophosphoryl lipid A). Elles présentent les mêmes caractéristiques en termes de phénotypes et fonctionnalités quel que soit leur provenance. Leur co-culture en présence de lymphocytes T a mis en évidence la capacité de ces cellules dendritiques tolérogènes à réduire la production de cytokines pro-inflammatoires et donc la réponse lymphocytaire T. Un essai clinique, dans la polyarthrite rhumatoïde, sur l'utilisation des cellules dendritiques tolérogènes a montré en phase I que leur injection au niveau local entraînait une amélioration des symptômes. Cependant, les effets n'ont pas été retrouvé au niveau systémique (Bell et al. 2017).

Une autre stratégie d'immunothérapie tolérogène consiste en l'administration de peptide libre par différentes voies. Par exemple, l'administration par voie orale, de façon répétée et à forte dose de la protéine basique de la myéline (MBP) supprime les symptômes de l'EAE (Benson et al. 1999). Cependant, l'administration de fortes doses

répétées d'Ag n'est pas compatible pour une transposition chez l'homme. Dans une autre étude, un peptide analogue de la MBP est administré par voie nasale et de façon répétée chez l'animal, ce qui permet l'induction de lymphocytes T régulateurs et la production de cytokine anti-inflammatoire, IL-10 (Sundstedt et al. 2003).

L'utilisation de NP constitue également une approche d'immunothérapie tolérogène et fait l'objet de notre étude.

## **b. Les nanoparticules**

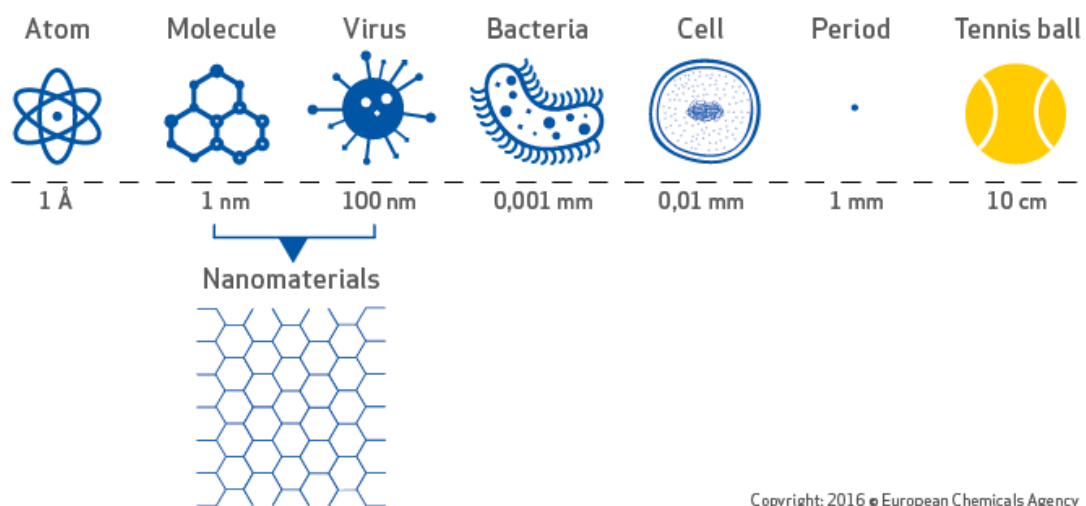
### Historique

Si les nanotechnologies sont aujourd'hui bien connues et largement utilisées, leur histoire remonte en 1959 où, lors d'une conférence, Richard Feynman introduit pour la première fois la notion de nanotechnologie par sa conférence intitulée « Il y a beaucoup de place en bas », suggérant l'étude de l'infiniment petit. En 1974, Norio Tanguchi emploie en premier le terme de nanotechnologie, « le définissant comme un procédé de séparation, consolidation et déformation des matériaux par un atome ou une molécule ». Ce n'est qu'en 1981 que le développement des nanotechnologies va faire un bond en avant avec le développement du microscope à effet tunnel par Gerd Binnig et Heinrich Rohrer, permettant d'observer la matière à l'échelle de l'atome. S'en suit la découverte des fullerènes, molécule de carbone de forme géométrique type sphère, en 1985 et celle des nanotubes de carbone en 1991. Les années 90 voient également l'émergence des premiers produits de consommation contenant des nanotechnologies et notamment l'utilisation de liposomes dans les cosmétiques. En 1999 est créé en France le réseau de recherche en micro et nanotechnologies. Depuis, les nanotechnologies n'ont cessé de se développer et ce dans tous les domaines.

## Définition

Les nanotechnologies sont identifiées comme regroupant l'ensemble des outils et des techniques permettant l'étude ou les interactions à l'échelle du nanomètre (nm). Les nanomatériaux sont déjà largement utilisés dans différents domaines tels que l'électronique, le textile ou les cosmétiques. Le domaine de la santé ne fait pas exception et ces outils peuvent s'avérer très utiles dans l'aide au diagnostic et en thérapeutique. L'intérêt principal de ces nanomatériaux leur est conféré par leur taille (Figure 35).

## Nanotechnology



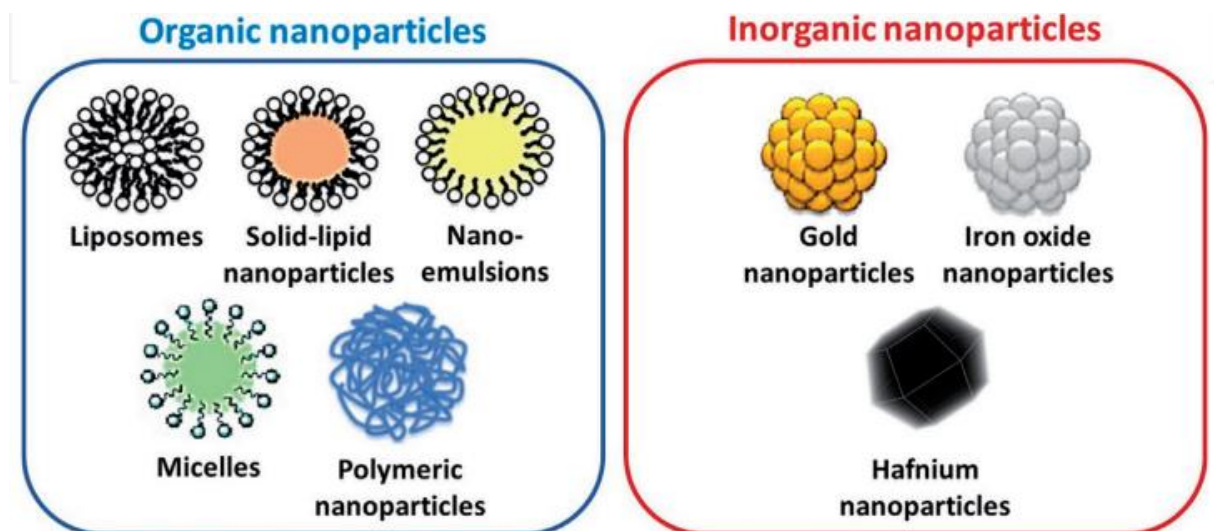
Copyright: 2016 • European Chemicals Agency

**Figure 35 : Echelle de la représentation de la taille des nanomatériaux.**

Parmi ces nanomatériaux, il est compté les NP, définies par la norme ISO TS/27687 comme « un nano-objet dont les trois dimensions sont à l'échelle nanométrique, c'est-à-dire une particule dont le diamètre nominal est inférieur à 100 nm environ ».

## Caractéristiques

Les NP peuvent être de différentes natures et selon les matériaux utilisés elles pourront être qualifiées d'organique ou de non organique (**Figure 36**) (Ahmed Hamed Khalil, A. Arida, et Ahmed 2020). Les NP non biodégradables présenteront un risque d'accumulation dans les tissus de l'organisme. Parmi les NP inorganiques il est retrouvé par exemple les NP à base de métaux, plus couramment utilisées en imagerie biomédicale chez l'animal. Les liposomes ou les NP à base de polymères font quant à eux partis des NP organiques et peuvent être utilisés à des fins de vecteurs.



**Figure 36 : Classification des différents types de NP.**

Les NP peuvent être classées en deux catégories principales. La première, les NP organiques qui comprennent les liposomes, micelles, émulsions ou encore polymères. La seconde, les NP inorganiques qui sont formulées à base de métaux (Ahmed Hamed Khalil, A. Arida, et Ahmed 2020).

La taille des NP leur confère la possibilité de passer au travers des barrières physiologiques et d'être compatible avec une injection i.v. En effet, une taille trop

importante pourrait être la cause d'embolie lors de l'injection. Leur taille impacte également leur mode d'internalisation (Hillaireau et Couvreur 2009). Ainsi, la phagocytose concerne les NP de tailles très diverses. Des NP à base de polystyrène allant de 250 à 3000 nm peuvent être phagocytées. D'autres voies d'internalisation ne passant pas par la phagocytose sont impliquées en fonction de la taille des NP. Les NP ayant une taille inférieure à 200 nm sont majoritairement endocytées *via* la voie des clathrines. Au fur et à mesure que la taille des NP augmente, la voie principale d'endocytose passera par les cavéoles. Cette voie est prédominante pour des NP de 500 nm (Hillaireau et Couvreur 2009).

Un autre paramètre important est la charge de surface des NP, mesurée par le potentiel zeta. La charge portée à la surface des NP influence davantage l'absorption que la taille. En effet, il est admis que les membranes cellulaires sont chargées négativement, ce qui faciliterait les interactions avec les NP chargées positivement et leur endocytose par absorption (Mc Carthy et al. 2015). A l'inverse, les NP portant une charge de surface négative sont internalisées après marquage par un ligand qui se lie ensuite à son récepteur à la membrane. La liaison et la phagocytose apparaissent plus élevées pour ce type de NP (Hillaireau et Couvreur 2009). Si la charge de surface positive peut sembler avantageuse par ses interactions facilitées avec les membranes des cellules, cela engendre néanmoins des interactions non voulues avec par exemple des protéines du complément. De plus, des déformations des membranes et des pores ont été rapportées engendrant une cytotoxicité (Mc Carthy et al. 2015; J. Zhao et Stenzel 2018).



### c. Applications des nanoparticules dans le domaine biomédical

L'étendue des domaines et la diversité des applications possibles des NP dans le domaine biomédical découlent de leurs propriétés multiples. Ces caractéristiques propres aux NP permettent de les « fonctionnaliser ». Cette fonctionnalisation peut être de différents ordres. Ainsi, il est possible de fixer un Ac à la surface des NP permettant de les adresser vers un type cellulaire particulier. Cette technique peut être utilisée pour visualiser en imagerie moléculaire une inflammation en ciblant les molécules VCAM, fortement exprimées dans ces conditions au niveau vasculaire (Pagoto et al. 2016). Ceci permettrait une alternative aux produits de contrastes actuellement utilisés pour l'imagerie IRM. Les NP d'oxyde de fer ont montré leur efficacité dans l'imagerie de l'AVC dans un modèle murin pouvant permettre une amélioration du diagnostic et de la prise en charge (Montagne et al. 2012; Gauberti et al. 2013). Une autre technique de « fonctionnalisation » est l'encapsulation au sein des NP de médicaments, peptides, ... offrant une capacité de vecteurs et de ciblage spécifique aux NP, permettant d'impacter la délivrance de médicaments. L'objectif étant d'augmenter l'efficacité et la biodisponibilité tout en diminuant la toxicité. Dans le cadre des maladies touchant le SNC, une des principales contraintes est le passage de la BHE pour les traitements administrés. Dans ce cas, les NP biodégradables tels que les liposomes, pourraient apporter une solution en encapsulant des agents pharmacologiques et permettraient leur délivrance dans le SNC. L'entrée dans le SNC peut se faire par différentes voies d'administration différentes, passant par la BHE ou une autre voie telle que la voie nasale (Andrieux et Couvreur 2012; Adnet et al. 2020). Cette qualité de vecteur peut également être utilisée afin de réorienter l'utilisation de médicament déjà existant pour une autre indication. Par exemple, le captopril, inhibiteur de l'enzyme de conversion possédant une indication dans le traitement de

l'hypertension artérielle, est apporté directement *via* des liposomes à des fibroblastes d'une tumeur pancréatique et permet, de par son action locale, une meilleure pénétration de l'agent anticancéreux (Chen et al. 2022).

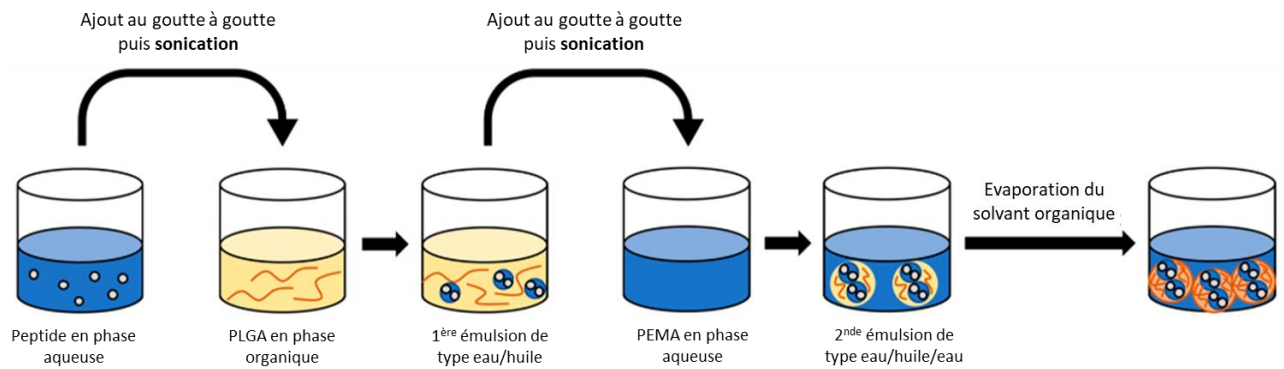
Ces propriétés de ciblage spécifique ou d'encapsulation des NP ont suscité un fort intérêt dans leur utilisation dans le cadre de l'immunité et plus spécifiquement dans l'induction de tolérance immunitaire (Ahmad, Al-Hatamleh, et Mohamud 2021).

#### d. Les nanoparticules et stratégie d'immunothérapie tolérogène

L'impact des NP sur le système immunitaire et sa réponse dépend de leur nature et leurs propriétés. Ainsi, elles peuvent être utilisées en tant qu'adjuvant pour modifier la réponse ou pour cibler un sous-type cellulaire particulier (Mitarotonda et al. 2022; Ahmad, Al-Hatamleh, et Mohamud 2021). La possibilité de les fonctionnaliser avec une molécule particulière permet, dans les pathologies autoimmunes, de cibler une réponse Ag spécifique. Ainsi, la vectorisation d'un Ag permet l'induction de lymphocytes T régulateurs ou encore de modifier la balance lymphocytes T régulateurs / lymphocytes T effecteurs en faveur d'une tolérance (Cappellano et al. 2019). Parmi les NP, celles à base de poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA), biocompatibles et non toxiques, ont montré leur intérêt dans le potentiel traitement de maladies autoimmunes.

Les NP présentées dans les modèles pré-cliniques ci-dessous sont formulées à base de PLGA. Il s'agit du même type de NP que nous avons utilisé pour notre étude. Ces NP sont obtenues au cours d'un procédé de formulation impliquant une double émulsion (eau/huile/eau) et une sonication (Figure 37). Le PLGA est un polymère

biodégradable et biocompatible, soluble dans les solvants organiques. Il possède la capacité de modifier sa surface ce qui permet sa liaison ou l'encapsulation de molécules. Leur dégradation peut passer par une hydrolyse, une oxydation ou être enzymatique. La dégradation est impactée par la température et le pH (Chavan et al. 2022). Au cours du procédé de formulation, le PLGA est solubilisé dans du dichlorométhane puis le peptide en solution aqueuse est ajouté. Une première sonication a lieu avant d'ajouter la solution obtenue au PEMA (poly(éthylène-*alt*-maleic anhydride)) aqueux. Ce dernier est un tensio-actif anionique. Un tensio-actif est une molécule amphiphile, c'est-à-dire qu'elle est composée d'une partie hydrophile et d'une partie hydrophobe. La particularité « anionique » lui est attribuée lorsque la partie hydrophile est chargée négativement. Ses caractéristiques lui confèrent la capacité de modifier la tension superficielle entre deux surfaces, permettant la solubilisation et la stabilisation des systèmes. Une seconde sonication a lieu, suivie de l'évaporation du dichlorométhane. Après lavages, la solution contenant les NP synthétisées est lyophilisée afin d'obtenir une poudre à conserver avant réhydratation et l'administration.

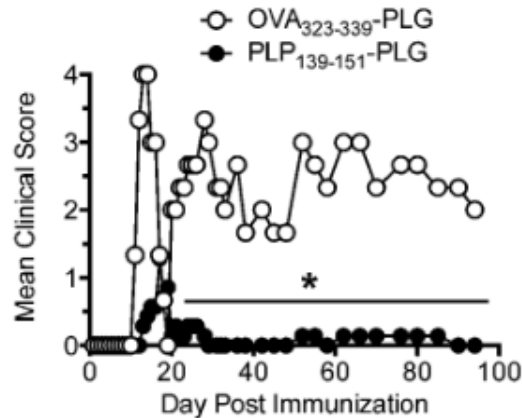


**Figure 37 : Formulation de NP PLGA.**

Les NP sont obtenues par un procédé de double émulsion et sonication. Le peptide en phase aqueuse est ajouté au PLGA solubilisé dans le dichlorométhane. La première sonication permet l'obtention d'une première émulsion de type eau dans huile. Cette émulsion est ajoutée au PEMA solubilisé dans l'eau. La seconde sonication permet l'obtention de la seconde émulsion de type eau dans huile dans eau. L'évaporation du dichlorométhane permet l'obtention de l'émulsion finale des NP contenant le peptide encapsulé. NP, nanoparticule; PLGA, poly(lactic-co-glycolic acid); PEMA, poly(ethylene-*alt*-maleic anhydride). Adapté de (Kim *et al.* 2019).

### Les nanoparticules dans le modèle d'EAE

Le modèle EAE est un modèle murin de SEP. Cette pathologie est définie par la destruction de la gaine de myéline entourant les neurones par des lymphocytes T pathogéniques (Dendrou, Fugger, et Friese 2015). Hunter et collaborateurs ont fonctionnalisé des NP à base de PLGA avec un peptide de la PLP<sub>139-151</sub> (proteolipid protein), un Ag de la myéline, utilisé pour l'induction d'un modèle EAE récurrente-rémittente (Hunter *et al.* 2014). L'injection aux animaux par voie intra-veineuse (i.v.), de ces NP couplées au peptide, en amont de l'immunisation (induction du modèle), permet de prévenir le développement de la pathologie (Figure 38).

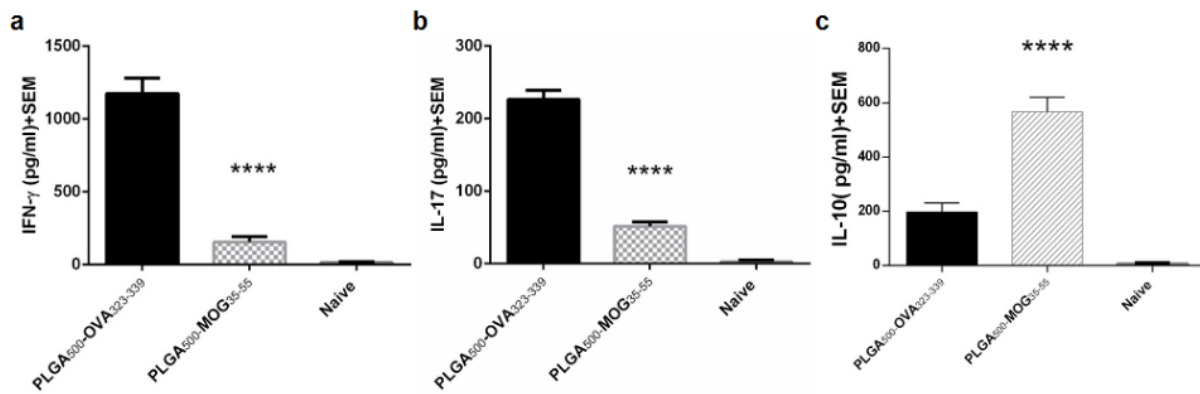


**Figure 38** : Effet de l'injection de NP dans un modèle EAE.

L'injection i.v. des NP couplées au peptide PLP aux animaux est réalisée en amont de l'immunisation. L'évaluation clinique des animaux est réalisée à partir de l'immunisation. OVA, peptide contrôle ovalbumine ; PLP, peptide d'immunisation issu de la « proteolipid protein » de la myéline ; \* $p < 0,05$  (d'après Hunter et al. 2014).

Ces données pré-cliniques sont associées à une diminution de l'infiltration des cellules immunitaires dans le SNC. Plus spécifiquement, les lymphocytes Th1 et Th17 sont diminués par rapport à la situation témoin.

Une autre équipe, utilisant le peptide MOG<sub>35-55</sub> (myelin oligodendrocyte glycoprotein) dans un modèle d'EAE primaire progressive montre des résultats pré-cliniques similaires suite à l'administration préventive de NP PLGA couplées au peptide MOG 7 jours en amont de l'immunisation (Gholamzad et al. 2020). L'évaluation du taux de lymphocytes T régulateurs dans la rate montre que ceux-ci sont plus élevés chez les animaux ayant reçu les NP-MOG. De plus, l'étude du profil cytokinique révèle que la balance entre les cytokines pro-inflammatoires (IFN- $\gamma$  et IL-17) et anti-inflammatoire (IL-10) est inversée entre les animaux avec NP tolérogènes et leur contrôle (Figure 39).



**Figure 39** : Sécrétion de cytokines dans la rate des souris EAE préalablement injectées avec des NP couplées au peptide.

Les splénocytes de souris EAE préalablement injectées avec des NP couplées au peptide MOG ou OVA 7 jours avant l'immunisation, ont été mis en culture pendant 72h en présence du peptide MOG, puis la concentration en cytokines IFN- $\gamma$  (a), IL-17 (b) et IL-10 (c) a été mesurée dans les surnageants. PLGA-OVA, NP contrôle avec le peptide ovalbumine ; PLGA-MOG, NP avec le peptide MOG. n=5, \*\*\*\*p<0,0001 (Gholamzad *et al.* 2020).

L'utilisation de NP formées cette fois-ci par des liposomes donne des résultats équivalents que ce soit sur les signes pré-cliniques, l'induction de lymphocytes T régulateurs, la diminution des cytokines pro-inflammatoires ou l'augmentation de cytokine anti-inflammatoire (Kenison *et al.* 2020).

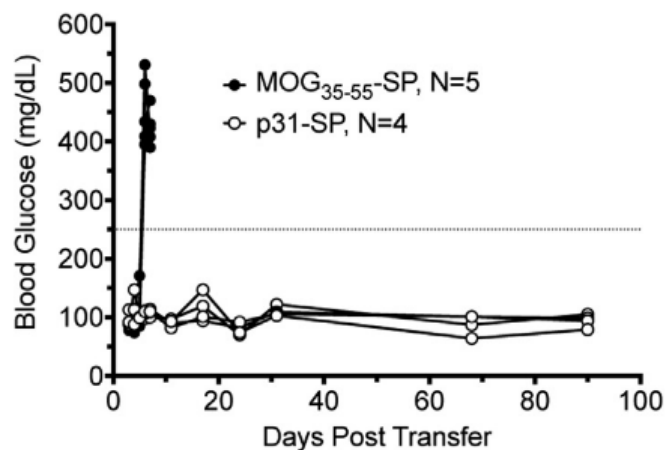
L'ensemble de ces données mettent en avant l'efficacité de l'immunothérapie tolérogène induite par les NP associées à un peptide spécifique dans les modèles animaux.

### Les nanoparticules dans un modèle de diabète de type 1

Le diabète est type 1 (DT1) est une pathologie autoimmune caractérisée par la destruction des cellules  $\beta$  du pancréas, responsables de la sécrétion d'insuline, faisant

augmenter anormalement le taux de glucose dans le sang. Ces cellules sont la cible de lymphocytes T CD4 et CD8 auto-réactifs (Boldison et Wong 2016).

Prasad et collaborateurs ont associé un peptide (p31 peptide), mimétique de la séquence de la chromogranine A<sub>(29-42 et 358-371)</sub> reconnue par les lymphocytes T sur les cellules pancréatiques, à des NP PLGA (Prasad et al. 2018). L'injection de ces NP à une souche de souris développant un DT1 permet de réduire l'incidence de la pathologie. Le taux de glucose présent dans le sang reste stable alors que les animaux ayant reçu les NP avec le peptide contrôle (MOG) voient leur taux augmenter très rapidement (Figure 40).



**Figure 40** : Effet de l'injection de NP associées au peptide p31 dans un modèle murin de DT1.

Les NP sont injectées à J0 et J1 de l'induction du modèle. Le taux de glucose est mesuré dans le sang. MOG-SP, NP avec le peptide contrôle ; p31-SP, NP avec le peptide de la chromogranine A (d'après Prasad et al. 2018).

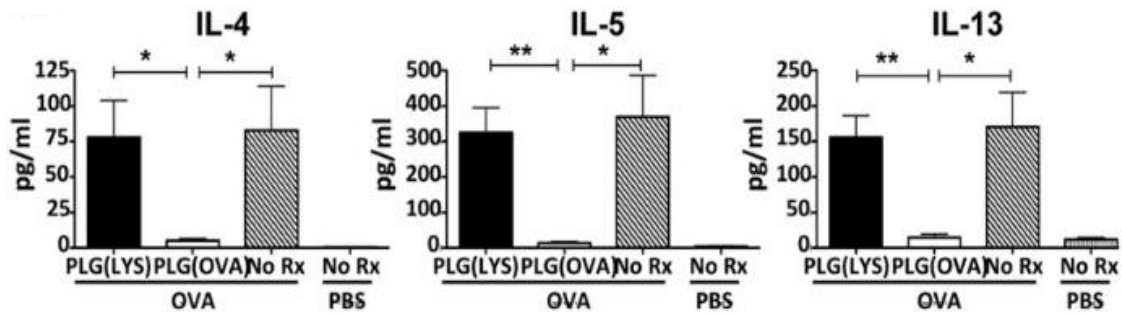
L'analyse des cytokines montre une quasi-absence des cytokines pro-inflammatoires IFN- $\gamma$ , IL-2 et GM-CSF dans le pancréas alors que celles-ci sont présentes chez les animaux contrôles. De plus, la cytokine anti-inflammatoire IL-10,

est augmentée dans les splénocytes et une augmentation des lymphocytes T régulateurs à la fois dans la rate et dans le pancréas est observée. Ceci suggère la diminution de lymphocytes T activés au niveau du pancréas et donc l'induction d'une tolérance par les NP.

### Les nanoparticules dans un modèle d'inflammation respiratoire allergique

Les réponses allergiques sont causées par des lymphocytes Th2 qui produisent de l'IL-4, IL-5 et IL-13. Smarr et collaborateurs, au travers d'un modèle murin d'inflammation respiratoire, ont cherché à inhiber cette réponse Th2 à l'aide de NP à base de PLGA (Smarr et al. 2016). Le modèle est induit par deux injections d'ovalbumine en i.p. en présence d'aluminium. Avant prélèvements des tissus et du BALF (bronchoalveolar lavage fluid), les animaux inhalent de l'ovalbumine en aérosol en séquence de 20 minutes pendant 3 jours. L'injection de NP, contenant le peptide ovalbumine, à 7 jours en amont de l'induction, permet de réduire significativement la réponse Th2 (**Figure 41**). En effet, les cytokines produites par ce type cellulaire sont significativement diminuées au niveau des poumons.





**Figure 41** : Mesure des cytokines provenant du surnageant du BALF dans un modèle allergique d'inflammation des voies respiratoires.

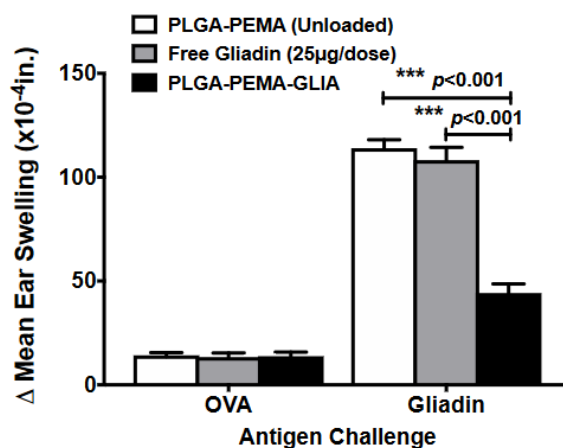
Les NP (OVA ou LYS pour les contrôles) ont été injectées 7 jours avant l'induction du modèle par injection d'ovalbumine en présence d'aluminium. Avant prélèvement, les animaux ont subi 20 minutes d'aérosols d'ovalbumine durant 3 jours. PLG(OVA), NP ovalbumine ; PLG(LYS), NP lysosyme (contrôle).  $n=5$ , \* $p<0,05$ , \*\* $p<0,01$  (adapté de Smarr et al. 2016).

La production des cytokines IFN- $\gamma$  et IL-17, correspondant aux lymphocytes Th1 et Th17 n'a pas été différente entre les groupes de souris avec les NP ovalbumine ou les NP contrôle.

### Les nanoparticules dans un modèle de maladie cœliaque

La maladie cœliaque se définit comme une hypersensibilité au gluten. La présence de gluten dans le tractus intestinal conduit l'activation et la différenciation des lymphocytes T en lymphocytes Th1. Une production d'IFN- $\gamma$  s'en suit, entraînant une altération de la muqueuse intestinale à l'origine des symptômes de la maladie (Nilsen et al. 1998). Freitag et collaborateurs ont évalué l'induction d'une immunothérapie tolérogène dans un modèle murin de maladie cœliaque (Freitag et al. 2020). A l'inverse des pathologies précédentes où la rupture de tolérance concernait des Ag du « soi », il s'agit ici d'une hypersensibilité à une molécule exogène.

Le modèle est induit par une immunisation active avec la protéine gliadine, protéine entrant dans la composition du gluten. L'immunisation fait suite à un traitement par NP PLGA, 7 jours auparavant, contenant la protéine gliadine encapsulée (Freitag et al. 2020). Les résultats mettent en évidence la prévention d'une hypersensibilité à la gliadine (Figure 42).



**Figure 42 : Effet de l'injection de NP PLGA contenant la protéine gliadine dans un modèle de maladie cœliaque.**

Les NP ont été injectées 7 jours avant l'immunisation avec la protéine gliadine. Au 14<sup>e</sup> jour suivant l'immunisation, les animaux reçoivent une injection de gliadine ou ovalbumine (contrôle) en intra-dermique, derrière l'oreille. La mesure du gonflement de l'oreille mesurée à 24h permet de déterminer l'hypersensibilité. OVA, ovalbumine (D'après Freitag et al. 2020).

Dans un modèle de transfert passif de lymphocytes T mémoires, issus d'animaux préalablement immunisés, dans des souris déficientes *RAG*, l'injection de NP diminue la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires IFN- $\gamma$ , IL-17 et IL-2, et augmente celle de la cytokine anti-inflammatoire IL-10 après restimulation par l'Ag. Ceci définissant la

diminution du profil Th1 et Th17 des lymphocytes T et l'induction de lymphocytes T régulateurs.

L'ensemble de ces données, sur différents modèles expérimentaux et diverses pathologies, montre une spécificité et une efficacité de l'induction d'une tolérance immunitaire envers un peptide ou une protéine. Ceci ouvre un large champ d'applications de l'utilisation des NP dans différentes pathologies autoimmunes, et notamment l'intérêt de cette approche dans notre pathologie d'étude, l'EA à Ac anti-NMDAR.

Les stratégies d'immunothérapies tolérogènes par NP PLGA présentées dans les différents modèles murins ci-dessus montrent une action sur la réponse lymphocytaire T. Cependant, dans l'EA à Ac anti-NMDAR, la pathologie est imputée aux Ac encéphalopathogéniques. Dans le modèle de maladie cœliaque, Freitag et collaborateurs ont mis en évidence, associé à une diminution des lymphocytes T effecteurs, une diminution des Ac anti-gliadine (Freitag et al. 2020). Ces données montrent un impact sur la production d'Ac lors d'une action tolérogène sur les lymphocytes T et par conséquent que l'induction d'une immunothérapie tolérogène par NP PLGA pourrait être efficace dans notre modèle murin.

**Pour résumer :**

- Les traitements de l'EA à Ac anti-NMDAR, et des pathologies autoimmunes en générale, sont efficaces mais aussi à l'origine d'effets secondaires et de toxicité. Des immunothérapies visant à induire un état de tolérance en absence de toxicité sont à l'étude.
- Il existe différentes façon d'induire une immunothérapie tolérogène dont celle passant par l'utilisation de NP.
- Les NP sont des nanomatériaux à l'échelle nanométrique et peuvent être de nature organique ou inorganique.
- Leur taille et leur charge de surface influencent leurs propriétés et leur internalisation.
- Dans les stratégies d'induction de tolérance immunitaire il est possible de fixer ou d'encapsuler un Ag spécifique sur/dans des NP.
- Les NP PLGA se sont révélées très efficaces dans l'induction d'une tolérance immunitaire dans diverses pathologies autoimmunes chez l'animal.



## II. OBJECTIFS



## Objectifs

L'EA à Ac anti-NMDAR est une pathologie de description récente. A ce jour les deux causes connues sont un syndrome paranéoplasique (le plus souvent un tératome ovarien) ou une infection à HSV (Dalmau, Geis, et Graus 2017). Les femmes jeunes sont principalement touchées et des troubles neurologiques et psychiatriques sévères sont observés, pouvant évoquer une schizophrénie. Le diagnostic de cette pathologie repose en outre sur l'identification d'Ac anti-NMDAR dans le LCR dont le rôle pathologique a été démontré dans cette maladie (Graus et al. 2016).

A l'heure actuelle, les mécanismes en amont de la réponse Ac ne sont pas élucidés dans cette pathologie. Une collaboration entre les lymphocytes B et les lymphocytes T peut être nécessaire pour la mise en place d'une réponse immunitaire avec la production d'Ac. Ce rôle des lymphocytes T, et notamment les lymphocytes T CD4, n'est que très peu étudié chez l'homme. Plusieurs modèles de cette pathologie ont été développés *via* une immunisation avec un peptide ou une protéine issus de la sous-unité GluN1 du NMDAR. Notre laboratoire a mis en place un modèle d'immunisation active, avec le peptide GluN1<sub>359-378</sub>, mettant en évidence une réponse lymphocytaire B *via* la production d'Ac spécifiques ainsi qu'une infiltration de lymphocytes B dans le SNC (Wagnon et al. 2020).

Le traitement des maladies autoimmunes repose fréquemment sur l'utilisation d'immunosuppresseurs ou d'immunomodulateurs. Ces traitements, bien qu'efficaces, s'avèrent non spécifiques et parfois toxiques. L'induction d'une tolérance immunitaire reste depuis plusieurs décennies un objectif majeur dans la prévention et le traitement de ces maladies. Dans ce contexte, les NP organiques couplées à un peptide, se sont révélées particulièrement efficaces dans le traitement des pathologies autoimmunes



chez l'animal, telles que l'EAE, modèle de sclérose en plaques (Hunter et al. 2014; Gholamzad et al. 2020).

Les objectifs de notre étude ont été :

- Identifier et caractériser les lymphocytes T spécifiques de GluN1<sub>359-378</sub> dans notre modèle d'EA à Ac anti-NMDAR.
- Mettre au point une stratégie d'immunothérapie tolérogène dans notre modèle à l'aide de NP à base de PLGA contenant le peptide d'immunisation (collaboration avec le Pr Malzert-Fréon et Dr Groo du Centre d'Etude et de Recherche sur le Médicament de Normandie (CERMN) ainsi que l'équipe du Pr Miller de l'Université de Northwestern de Chicago).

### III. RESULTATS



## Résultats

*Article en préparation*

Tolerogenic effect of antigen-encapsulating nanoparticles toward specific T cell response against N-methyl-D-aspartate receptor in an autoimmune encephalitis model.

LESEC Léonie<sup>a</sup>, REGNAULD Caroline<sup>a</sup>, FURON Jonathane<sup>a</sup>, MAZERT-FREON Aurélie<sup>b</sup>, GROO Anne-Claire<sup>b</sup>, MILLER Stephen<sup>c</sup>, NEEF Tobias<sup>c</sup>, LEPRINCE Jérôme<sup>d</sup>, LEFRANC Benjamin<sup>d</sup>, VIVIEN Denis<sup>a,e</sup>, DOCAGNE Fabian<sup>a</sup>, LE MAUFF Brigitte<sup>a,f</sup>, TOUTIRAIS Olivier<sup>a,f</sup>

<sup>a</sup> Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, France.

<sup>b</sup> Normandie Univ, UNICAEN, CERMN, F-14000 Caen, France.

<sup>c</sup> Department of Microbiology-Immunology, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL and Interdepartmental Immunobiology Center, Feinberg School of Medicine, Northwestern University, Chicago, IL, USA

<sup>d</sup> Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Rouen, France

<sup>e</sup> Department of clinical research, Caen University Hospital, CHU Caen, France.

<sup>f</sup> Department of Immunology and Histocompatibility (HLA), Caen University Hospital, CHU Caen, France.

## ABSTRACT

Anti-N-Methyl-D-Aspartate receptor (NMDAR) autoimmune encephalitis (NMDAR AE) is an autoimmune disease characterized by severe psychiatric and neurological symptoms. While the pathogenic role of antibodies (Ab) directed against the GluN1 subunit of NMDAR is well described in this disease, the immune mechanisms involved in the generation of the autoimmune B cell response, especially the role of T helper cells, are poorly understood. Previously, we have developed a B-cell-mediated mouse model of NMDAR-AE by immunization with a GluN1<sub>359-378</sub> peptide that drives a series of symptoms that recapitulate AE such as anxiety behavior and spatial memory impairment. Here, in this mouse model, we highlighted anti-GluN1 specific CD4<sup>+</sup> but also CD8<sup>+</sup> T cells in both spleen and meninges. T helper cells have a polyfunctional profile suggesting a T and B cell crosstalk to generate anti-GluN1 pathogenic Abs. Interestingly, the use of a tolerogenic strategy with PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)) nanoparticles (NPs) loaded with antigen, decreased T cell response against GluN1 peptide without affecting symptoms of the disease. In conclusion, this study identified, for the first time, a potential contribution of T helper cells in the pathology of NMDAR AE and pave the way for the development of future NP-based tolerogenic approaches to treat relapses.

## INTRODUCTION

Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) autoimmune encephalitis (NMDAR AE) was first described in 2007 as an autoimmune disorder affecting mostly young women [1]. The disease is diagnosed in patients with psychiatric symptoms including memory loss, catatonia, hallucinations and neurologic manifestations such as seizures and autonomic dysfunctions. The cause of this encephalitis was attributed to cerebrospinal fluid (CSF) antibodies (Ab) that recognize the subunit GluN1 of the NMDAR. Patient CSF-derived Abs induce NMDAR internalization in neuron cultures, in vitro and trigger symptoms of depression and memory deficits following intrathecal infusion in mice [2,3]. Paradoxically, while pathogenic mechanisms of anti-NMDAR Abs are well documented, upstream immunological processes that lead to the humoral response are poorly understood. Follicular helper CD4 T (Tfh) cells are associated with autoAbs-mediated immune diseases [4]. In NMDAR AE, it was observed immunoglobulin gene somatic mutations and isotype switching in some B cells from patients' CSF, two features in favor of T cell-B cell cooperation. Moreover, a study reports antibody-secreting plasma cells, T and B cell infiltration in perivascular spaces in the brain of patients with anti-NMDAR AE [5].

Several disease models based on active immunization with NMDAR peptide or proteins have been developed. Jones *et al* shown that injection of NMDAR proteins composed of GluN1 and GluN2B subunits embedded in liposomes induce neurological symptoms including hyperactive locomotor activity and anxiety-like behaviors [6]. Interestingly, T and B cell infiltration was found in parenchyma in immunized mice and T cell receptor-deficient mice did not develop the disease following immunization with NMDAR protein suggesting that T cells are required to induce encephalitis. We have also developed a mouse model of encephalitis by immunizing mice with GluN1<sub>359-378</sub>

peptide that encompasses the ATD N368/G369 amino acids described as key residues for the binding of pathogenic Abs [7]. Mice immunized with GluN1<sub>359-378</sub> peptide, but not with irrelevant control peptide (GluN1<sub>168-187</sub> peptide) showed symptoms linked to encephalitis including spatial memory impairment and anxiety and depression-like behaviors. Although, CD4 T cell infiltration was not detected in hippocampus in our model, it did not rule out the contribution of T helper cells in B cell response into lymphoid organs.

Current treatments of autoimmune diseases aim to broadly suppress immune response in patients but could also be associated with toxicity and increased risk of opportunistic infections. Therefore, the development of tolerogenic immunotherapy to address this issue is an active area of research. Tolerogenic nanoparticles (NPs) such as poly(lactic-co-glycolic acid) (PLGA) are biodegradable molecules that emerge as powerful tools to carry Ag and to prevent autoimmunity as shown in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a CD4 T cell-mediated mouse model of multiple sclerosis [8].

Here, our aims were to characterize the anti-NMDAR T cell response and to develop an immunological tolerance approach based on PLGA NP in our AE model. GluN1-specific T cells were identified in lymphoid organs from the periphery and in the meninges of the central nervous system supporting a crosstalk between encephalotigenic T and B cells in AE model. Treatment with NP encapsulating GluN1 peptide reduced the T cell response in NMDAR AE mice but not the clinical symptoms measured by behavioral tests.

## MATERIALS AND METHODS

### Animals

C57BL/6 mice aged 6-10 weeks old from Janvier Labs were housed in our central house, CURB (Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Caen University, France), at controlled temperature (21 +/- 1°C) and humidity (55 +/- 10%) with food and water *ad libitum*. All procedures were performed according to the guidelines of the institutional ethics committee (Comité Normand d'éthique en matière d'expérimentation animale, CeNomExA). This was submitted to this committee for approval in accordance with the European directive N°2013/63/UE (Project licence number #23314).

### Active immunization

Autoimmune response was induced on 8 weeks old male C57BL/6 mice (Janvier Labs) by subcutaneous injection of 200µg of GluN1 peptide (GluN1 359-378) with 200µg of Complete Freund's Adjuvant (CFA, Sigma Aldrich) containing 800µg of inactivated particles of *Mycobacterium tuberculosis* (MBT, BD Biosciences). Control animals (sham) were injected with saline mixed with CFA and MBT. The emulsion was stirred at 4°C for 1h30 then administered to regions above the shoulder and the flanks into four sites (50µL at each injection site). All animals were intraperitoneally injected at days 0 and 2 with 200ng of pertussis toxin (Sigma Aldrich) in 200µL of saline.

### Isolation of spleen, meninges and choroid plexus

Immunized mice were anesthetized with isoflurane 5% (Aerrane, Baxter) and intracardially perfused with heparinized phosphate buffered saline (PBS, Sigma Aldrich) after removal of the spleen. Meninges were isolated from the brain cavity after



brain extraction from below. Choroid plexus were isolated from the 4th and lateral ventricles then dry frozen at  $-80^{\circ}\text{C}$ .

### **Cell culture of leukocytes from spleen and meninges**

Spleens were mechanically processed and the cells were passed through a  $40\mu\text{m}$  filter. Erythrocytes were lysed using a lysis buffer ( $0.15\text{ M NH}_4\text{Cl}$ ,  $9\text{ mM HKCO}_3$ ,  $0.5\text{ M EDTA}$ , pH 7.4 (Stemcell Technologies)) and the splenocytes were resuspended in supplemented sterile PBS with 10% fetal bovine serum (FBS, Stemcell Technologies). Meninges were enzymatically processed in PBS containing 1% collagenase-dispase ( $1\text{mg/mL}$ , Sigma Aldrich), 0.1% DNase I ( $1\text{mg/mL}$ , Worthington Biochemical) and 1% BSA ( $250\text{mg/mL}$ , Sigma Aldrich) at  $37^{\circ}\text{C}$ . Then, cells were passed through a  $70\mu\text{m}$  filter. Cells ( $10^5$ ) were plated on 96 well U bottom plates in  $200\mu\text{L}$  of Dulbecco's Modified Eagle's Medium – high glucose (DMEM, Sigma Aldrich) containing 1% penicillin-streptomycin ( $200\text{mM}$ , Sigma Aldrich), 1% Glutamax-I 100x (Gibco), 10% FBS and 0.1% 2-mercaptoethanol (Gibco), in presence of GluN1 peptide (UNIROUEN, INSERM, U1239) or CLIP peptide (GenScript) at  $20\mu\text{g/mL}$ .

### **Cell proliferation assay by carbofluorescein succinimidyl ester (CFSE) dilution**

Cells at  $1 \times 10^6$  /mL were incubated for 20 min at room temperature in PBS with  $0.5\mu\text{M}$  CFSE (Lifetechnologies). Cells were then washed and suspended in complete DMEM and were incubated with peptides as described above.

### **Flow cytometry**

Cells were resuspended in  $50\mu\text{L}$  of staining buffer and Fc receptors were blocked for 15 min at  $4^{\circ}\text{C}$  with  $10\mu\text{g/mL}$  anti-CD16/CD32 antibodies (BD Biosciences). Then, cells were labelled for 30 min at  $4^{\circ}\text{C}$  in dark with the following fluorochrome-conjugated

monoclonal antibodies BV510 anti-mouse CD3e, APC anti-mouse CD4, PE-Cy7 anti-mouse CD8, APC-Cy7 anti-mouse CD69, FITC anti-mouse CD44, PE anti-mouse CD45, BV421 anti-mouse CD62L, BV510 anti-mouse CD19, FITC anti-mouse CD45R-B220, APC anti-mouse GL7, PE-Cy7 anti-mouse CD138, 7-AAD (all from Biolegend), BV421 anti-mouse CD25 (BD Biosciences). Samples were acquired on FACSverse (BD Biosciences) and data were analysed with the FlowJo software (Verity Software).

### **Nanoparticle production**

PLGA NPs were prepared using a double emulsion process for peptide encapsulation as previously described [8]. NP size and  $\zeta$ -potential were measured by dynamic light scattering (DLS) and zeta potential analysis using a Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments Inc., Westborough, MA). PLGA NP encapsulated peptide was quantified using the CBQCA assay (Invitrogen).

### **Nanoparticles injection**

Each animal received 200 $\mu$ L of PBS containing 2.5 mg of NPs in intravenous injection, 7 days before active immunization. At least one representative of each group was present in the cage.

### **Cytokine Assays**

Supernatants from AE splenocytes in culture with GluN1 or CLIP peptide were collected and stored at -20°C before cytokine assay using U-PLEX Biomarker Group 1 assays (K15069L-1) kit from Meso Scale Discovery (MSD).

### **Behavior tests**

To assess cognitive functions, we used a two-trial place recognition task previously developed to study spatial cognition processes in rats and mice (Kraeuter et al., 2019).

The standard Y-maze used in this study consisted of white plastic with three identical arms (Imetronic). The behavioural procedure consisted in two trials separated by 3h intertrial interval. During the acquisition phase (trial 1), one chosen arm of the Y-maze was closed with a guillotine door. Each mouse was then placed in the start arm (arm A), the head facing away from the centre of the maze, and allowed to freely visit the accessible parts of the maze (arm A/arm B) for 5 min. During the test phase (trial 2), animals had free access to all three arms (arm A/arm B/ new arm C) for 2 min. Spatial performance was assessed through the comparison of the number of visits made in each arm. Anxious-like phenotype of mice was assessed by the elevated zero-maze (O-maze) (Cryan and Holmes, 2005). Behaviour in the O-maze reflects a conflict ('approach-avoidance') between the rodent's preference for protected areas and their innate motivation to explore novel environments. The apparatus (Imetronic) was a white circular PVC corridor which was equally divided into two opposite open quadrants and two opposite enclosed ones. Each mouse was placed in the centre of a randomly chosen closed quadrant, and was then allowed to explore freely the maze during 5 min period. Anxiety-like behaviour was assessed by the quantification of the time spent in the open quadrants. Spontaneous locomotor activity was quantified by actimetry using a rack of eight activity cages equipped with horizontal infrared beams located across the long axis of the cage (ImetronicVR). Mice were placed in individual acrylic chambers for 30 min. The number of horizontal movements was determined by breaks in movement-sensitive photo-beams that were then converted into locomotor activity counts. This test evaluates the hypo- or hyperactivity.

### **Statistical analyses**

Normality test were performed on all sample with a Shapiro-Wilk test. If normality was assumed, we used Student's t-test. When normality could not be assumed, we used a

non-parametric Mann-Whitney. To make comparaisons between all the different groups an ANOVA test was performed followed by the Tukey post-hoc test. Results are presented as the mean  $\pm$  SEM and were analysed with the GraphPad Prism software. Sample size are indicated in the text for each group and protocol. P values are given in the text for each individual experiment.

## RESULTS

### **Immunization with GluN1 peptide did not modify the adaptive immune cell repartition in both spleen and meninges of NMDAR-AE mice.**

We have analysed the distribution of the adaptive immune cells 7 and 15 days post-immunization in spleen. At day 7, each CD4<sup>+</sup> T cell subset and CD8<sup>+</sup> T cell subset constituted 40% of CD3<sup>+</sup> T cells in both sham and AE mice (**Fig 1A and B and supplementary Fig 1**). The CD4<sup>+</sup> T cell population decreased at day 15 and represented 10% of CD3<sup>+</sup> T ( $p=0.0016$ ) while the CD8<sup>+</sup> subset increased and constituted 60% of CD3<sup>+</sup> T cells ( $p<0.0001$ )

At day 7 and 15, the repartition in naive/memory CD4<sup>+</sup> T cells was similar in both sham and EA mice (**Fig 1B**). Naïve CD4<sup>+</sup> T cells were the major subset at day 7 but declined at day 15 whereas T<sub>cm</sub> and T<sub>em</sub> subsets approximately doubled between the two time intervals. For CD8 T cells, no modification in naive/memory phenotype was observed between day 7 and 15 (**supplementary Fig 1**).

While the frequency of CD19<sup>+</sup> B cell is similar in sham or NMDAR-AE mice (37% vs 33% at day 7 respectively), we observed a weak decrease of activated GL7<sup>+</sup> B cells and CD138<sup>+</sup> plasma cells only 7 days post-immunization in AE mice (**Fig 1C**). Between day 7 and 15, frequencies of activated GL7<sup>+</sup> B cells increased in AE mice ( $p<0.0001$ ).

At day 7, meninges of sham or AE mice contained about 20% of CD3<sup>+</sup> T cells among leukocytes (21% vs 20%, respectively) with a small proportion of CD4<sup>+</sup> T cells (10% vs 12.3% respectively) and a majority of CD8<sup>+</sup> T cells (41% vs 30.3% respectively) (**Fig 2A and B**). At day 15, the percentages of CD3<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup> were similar while CD8<sup>+</sup> T cells were significantly less abundant whatever in sham or AE mice ( $p=0.026$  for AE mice). Seven days following immunization, the percentage of CD19<sup>+</sup> B cells was 20% of leukocytes both in meninges of sham or AE mice (**Fig 2C**). The

percentages of activated GL7+ B cells (44% vs 39% at day 7 for sham vs AE conditions respectively) and CD138+ plasma cells (9% vs 8% at day 7 for sham vs AE conditions respectively) were not modified in both situations. At day 15, the proportion of CD19+ B cells but not activated GL7+ B cells nor CD138+ plasma cells significantly decreased ( $p=0.0035$  for AE mice ).

### **An anti-GluN1 specific T cell response is elicited both in periphery and in CNS in NMDAR-AE mice.**

Following *ex vivo* reactivation of T cells with the GluN1 peptide, we identified specific CD4+ T cells among splenocytes isolated at day 7, based on the expression of the activating marker CD25 : CD25 MFI was  $3253 \pm 258$  after reactivation GluN1 vs  $2148 \pm 247$  with the control peptide ( $p=0.0038$ ) (**Fig 3A and B**). Presence of anti-GluN1 specific T cells was more marked at day 15 as detected with both CD69 and CD25 markers: CD25 MFI was  $4310 \pm 201$  and CD69 MFI  $3128 \pm 223$  with GluN1 peptide vs  $2250 \pm 166$  and  $1869 \pm 82$  with the control peptide, respectively ( $p<0.0001$  for CD25 MFI and  $p<0.0001$  for CD69 MFI). At day 15, frequency of CD4+/ CD69+ cells was also increased after reactivation :  $8\% \pm 1.12$  are CD4+/CD69+ T cells after reactivation with GluN1 peptide vs  $3.68\% \pm 0.69$  with the control peptide ( $p=0.0008$ ).

We also detected GluN1 specific T cells among the CD8+ subset from splenocytes of AE mice but only at day 15 : CD69 MFI was  $3606 \pm 175$  with GluN1 peptide vs  $2570 \pm 90$  with the control peptide ( $p<0.0001$ ) (**supplementary Fig 2**). An increase of frequencies of CD8+/CD69+ cells and CD8+/CD25+ cells was observed after reactivation :  $48.3\% \pm 3.2$  are CD8+/CD69+ T cells and  $29.9\% \pm 2.1$  are CD8+/CD25+ T cells after reactivation GluN1 peptide vs  $24.3\% \pm 2.5$  and  $24.4\% \pm 1.6$  with the control peptide, respectively ( $p<0.0001$  for CD69 and  $p=0.0255$  for CD25).

The observation of GluN1-reactive cells was more obvious when cytometry analysis of T lymphocytes was performed in the gate of large cells at day 15 (**supplementary Fig 3**). We also confirmed the presence of anti-GluN1-specific CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells by CFSE-based cell proliferation assay in total and large cells; and by IFN- $\gamma$  ELISPOT assay (**supplementary Fig 4**). For large CD4<sup>+</sup> T cells, index proliferation was  $2.33 \pm 0.05$  with GluN1 peptide vs  $1.12 \pm 0.03$  with control peptide in AE mice ( $p < 0.0001$ ).

Interestingly, CD4<sup>+</sup> T cells able to recognize the GluN1 peptide were also detectable in meninges of AE mice at day 15 post-immunization:  $45\% \pm 4.92$  were CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> T cells and  $19.5\% \pm 4.15$  CD4<sup>+</sup>/CD40L<sup>+</sup> T cells after reactivation with GluN1 peptide vs  $31.7\% \pm 1.8$  were CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> T cells and  $11.8\% \pm 2.9$  CD4<sup>+</sup>/CD40L<sup>+</sup> T cells with the control peptide ( $p = 0.0445$ ;  $p = 0.0286$ , respectively) (**Fig 3C**). No difference in the CD69 and CD40L MFI was observed between CD4<sup>+</sup> T cells from sham and EA mice.

### **Anti-GluN1 specific T cells preferentially display a Th1, Th2/Tfh and Th17 (Tfh) profile.**

Next, we analysed the functional properties of anti-GluN1 specific CD4 T cells in AE mice. Following reactivation with GluN1 peptide, splenocytes harboured a polyfunctional profile and secreted Th1 (IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  and MCP1), Th17 and Th2/Tfh (IL-4) cytokines (**Fig 4A**). The analysis of the T helper profile using chemokine and inhibitory receptors corroborated this finding. Indeed, GluN1-reactive CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>+</sup> T cells significantly expressed, than CD4<sup>+</sup>/CD69<sup>-</sup> T cells, higher levels of CXCR3, CCR6 and CXCR5/PD1 associated with Th1, Th17 and Tfh profiles, respectively (**Fig 4B**).

### **Treatment with PLGA nanoparticles encapsulating GluN1 prevents the specific T cell response.**

Previous reports have shown the efficacy of i.v infusion of Ag-encapsulated NPs for the induction of tolerance to prevent or treat neuroinflammatory diseases in animal models [8]. Here, we investigated the ability of GluN1-encapsulated NPs (GluN1-NPs) to reduce both immune response and symptoms of AE. NPs were performed with PLGA in a double emulsion process. The size, surface charge and the encapsulation rate are summarized in Table 1. These physicochemical properties are in the range of values in previous studies using PLGA-NP [9]. Our encapsulation rate showed a antigen loading of 3 $\mu$ g/mg of NPs.

Animals were treated with GluN1-NPs or control NPs (OVA-NPs) one week before immunization with the GluN1 peptide (**Fig 5A**). Two weeks after immunization, we detected a specific T cell response in both groups after *in vitro* reactivation with the relevant peptide as compared with control peptide (**Fig 5B and C**). Importantly, we observed that the anti-GluN1 CD4<sup>+</sup> T cell response was hampered in mice treated with GluN1-NPs vs OVA-NPs : CD69 MFI was 2400  $\pm$  221 after reactivation with GluN1 peptide in mice infused with GluN1-NPs vs 3422  $\pm$  270 in mice infused with OVA-NPs ( $p=0.0091$ ) (**Fig 5B**). The biological effect was more distinct in activated large CD4<sup>+</sup>T cells : CD25 MFI was 4156  $\pm$  339 and CD69 MFI 2723  $\pm$  326 after reactivation with GluN1 peptide in mice treated with GluN1-NPs vs 10005  $\pm$  2568 and 5076  $\pm$  351 in mice treated with OVA-NPs, respectively ( $p=0.0059$  for CD25 MFI and  $p<0.0001$  for CD69 MFI) (**Fig 5C**). The similar tolerogenic effect of NP-GluN1 was also observed for the CD8<sup>+</sup> subset (**supplementary Fig 5**).



Unfortunately, Y and O-maze behavioural tests showed no difference between GluN1-NP or OVA-NP treated AE group (**Fig 6A and B**). Furthermore, the memory and anxiety impairment, usually observed with Y-maze and O-maze, respectively were not found in our control group OVA-NPs in AE mice.

## DISCUSSION

Accumulating evidences exist about the pathogenic roles of anti-NMDAR Abs that disturb the glutamatergic signaling on neurons by mainly inducing NMDAR internalization [10]. However, the immune mechanisms that lead to anti-NMDAR Ab production remain poorly explored. Here, we examined the effects of the immunization with GluN1 peptide on T and B cells compartments in the spleen and meninges. As compared with the sham condition, immunization with the specific peptide did not induce marked modifications in the global frequencies of B and T lymphocyte subsets. Nevertheless, in both conditions, we observed some changes at the two time points after immunization. In the spleen, the frequency of CD8<sup>+</sup> T cells is increased to the detriment of the CD4<sup>+</sup> T cell subset at day 15 post-immunization compared to day 7. The naïve/memory profile of CD4<sup>+</sup> but not CD8<sup>+</sup> T cells was modified and directed towards effector memory CD4<sup>+</sup> T cells. This observation is relevant since Lee *et al* have demonstrated that bystander activated memory CD4<sup>+</sup> T cells have a pathogenic function in EAE [11]. Unexpectedly, the frequency of B cells is decreased in the meninges at day 15 compared to day 7. These modifications that were independent of the stimulation with the GluN1 peptide may be attributable to the immunostimulatory effects of CFA and/or pertussis toxin.

Using several assays, we described for the first time a specific T cell response directed against the immunizing GluN1<sub>359-378</sub> peptide that induce AE-like symptoms in our model. Anti-GluN1 specific T cells were mostly detected in the spleen 15 days after the initial immunization that is consistent with data from active EAE models [12,13]. In AE mice, the T helper profile as determined by cytokine assay and chemokine receptor phenotyping was not skewed but polyfunctional with Th1, Th17 and Th2/Tfh cells, similarly as it was described in EAE [14,15]. These data suggest that multiple immune

interactions with various cell type may be required to trigger the AE disease. Our finding corroborated data published by Jones *et al* in another AE mice model induced by immunization with NMDAR receptors embedded in liposomes [6]. Using TCR alpha deficient mice, authors showed that anti-NMDAR Ab production and the trigger of behavioral symptoms required T cells. To date, only one study has investigated the anti-GluN1 peripheral CD4<sup>+</sup> T cell response in AE patients. Unexpectedly, Dao *et al* found a lower frequency of antigen specific CD4<sup>+</sup> T cells in NMDAR AE patients than in healthy donors suggesting that T cell help is not required for anti-NMDAR Ab production [16]. However, this study has two major limitations. First, biological analysis were performed with samples of patients collected after immunotherapy that could induce deletion or anergy of anti-GluN1 specific CD4<sup>+</sup> T cells even if anti-*candida albicans* CD4<sup>+</sup> T cell response is similar in the cohorts of patients and healthy donors. Secondly, authors have measured the specific production of TNF- $\alpha$  and IFN- $\gamma$ , two Th1-associated cytokines without showing difference between patients and healthy donors. It is possible that anti-GluN1 CD4<sup>+</sup> T cells in NMDAR AE patients concerned other Th profiles such as Th17 or Tfh profiles and so required the study of other cytokines such as IL-17 or IL-21, respectively.

Interestingly, we also detected specific CD4 T cells in meninges associated with a high frequencies of activated B cells and plasma cells. These data suggest a potential cross-talk between meningeal T cells and B cells. As described in EAE model, activated B cells may act as antigen presenting cells and restimulated specific T cells [17,18]. Activated B cells may also promote neuroinflammation by producing pro-inflammatory cytokines such as TNF- $\alpha$ , GM-CSF and IL-6 [19–21]. In turn, CD4 T cells could potentiate B cell and plasma cell response [22,23]. For example, it was shown in passive transfer model of EAE that Th17 are involved in infiltration of B cells and in

formation of ectopic lymphoid follicle-like structure containing T and B cells in subarachnoid space [23]. The role of brain-infiltrating Tfh cells is poorly understood in neuroinflammatory models. Guo *et al* have shown a correlation between infiltration of Tfh in spinal cord and EAE score and Quinn *et al* described that Tfh contribute to disease severity in EAE model induced by Th17 passive transfer [24,25].

Several T helper profile have been identified among splenocytes in our AE model. Unfortunately, experiments to analyze cytokine profile of meningeal T cells were unsuccessful due to the weak number of *ex vivo* cells isolated from the tissue (data not shown). Approaches of nucleic acid or protein high resolution profiling from tissues will be appropriate to characterize the T cell functional profile [26]. On the other hand, experiments of passive co-transfer of *in vitro* polarized anti-GluN1 T helper cells with anti-GluN1 Abs will be useful to decipher the immune mechanism in NMDAR AE as it was done in neuromyelitis optica rodent model with the aquaporin 4 autoantigen [27]. Of note, we also detected anti-GluN1-specific CD8<sup>+</sup> T cells in spleen and meninges of AE mice. In several studies, encephalitogenic anti-myelin CD8<sup>+</sup> T cells have been described in EAE [28,29]. Their mechanisms of action are not clearly established. For instance, Wagner *et al* have showed that anti-myelin CD8<sup>+</sup> enhanced reactive oxygen species production by monocyte-derived cells in the brain of EAE mice [30]. Regulatory function of CD8<sup>+</sup> CD28<sup>-</sup> T cells was also reported in EAE model. So, further investigations will be needed to know the function of anti-GluN1-specific CD8<sup>+</sup> T cells in AE mice.

Tolerogenic strategy using PLGA based antigen loaded NPs showed efficacy to reduce pathogenic T cell response in several disease models of multiple sclerosis, airway allergy, type 1 diabetes and celiac disease [8,31–33]. Here, we have expanded these observations to the NMDAR AE and provide evidence that NP encapsulating GluN1

are able to decrease the activation level of specific CD4+ and CD8+ T cells among splenocytes. In our study, NPs were injected intravenously and Hunter *et al* have described that this route of administration is more efficient than subcutaneous or intraperitoneal delivery to induce tolerance; likely due to the targeting of NPs into the spleen and liver [34]. These organs contain tolerogenic APCs that phagocytose NPs and could promote Treg expansion or inhibit effector T cell inhibition via the PD1/PD-L1 co-inhibitory pathway [8,35]. Future works will explore these tolerogenic mechanisms in our model. Additionally, intranasal delivery is a promising route of administration to investigate in order to induce mucosal tolerance by favoring transport of Ag to the sites of brain entry [36,37]. Although we have shown that NPs are able to decrease specific T cell response in NMDAR AE model, we cannot conclude on an effect of GluN1-NPs on behavior of AE mice due to the absence of behavioral phenotype in control mice (OVA-NPs). A different experimenter and external environmental factors such as cleanliness of the animal facilities could contribute to this discrepancy. These experiments should be repeated by including other behavior tests such as the three chamber test used in another AE model to conclude on the effects of tolerogenic NPs [6].

In conclusion, we demonstrated that GluN1-reactive T cells were generated both in spleen and meninges in NMDAR AE model suggesting their involvement in the pathogenic B cell response. Although many challenges remain to overcome, PLGA based tolerogenic strategy may provide an efficient approach to prevent relapses in AE patients.

## REFERENCES

- [1] J. Dalmau, T. Armangué, J. Planagumà, M. Radosevic, F. Mannara, F. Leypoldt, C. Geis, E. Lancaster, M.J. Titulaer, M.R. Rosenfeld, F. Graus, An update on anti-NMDA receptor encephalitis for neurologists and psychiatrists: mechanisms and models, *Lancet Neurol.* (2019). [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30244-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30244-3).
- [2] E.H. Moscato, X. Peng, A. Jain, T.D. Parsons, J. Dalmau, R.J. Balice-Gordon, Acute mechanisms underlying antibody effects in anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis, *Ann Neurol.* 76 (2014) 108–119. <https://doi.org/10.1002/ana.24195>.
- [3] J. Planagumà, F. Leypoldt, F. Mannara, J. Gutiérrez-Cuesta, E. Martín-García, E. Aguilar, M.J. Titulaer, M. Petit-Pedrol, A. Jain, R. Balice-Gordon, M. Lakadamyali, F. Graus, R. Maldonado, J. Dalmau, Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice, *Brain.* 138 (2015) 94–109. <https://doi.org/10.1093/brain/awu310>.
- [4] S. Crotty, T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases, *Immunity.* 50 (2019) 1132–1148. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2019.04.011>.
- [5] E. Martinez-Hernandez, J. Horvath, Y. Shiloh-Malawsky, N. Sangha, M. Martinez-Lage, J. Dalmau, Analysis of complement and plasma cells in the brain of patients with anti-NMDAR encephalitis, *Neurology.* 77 (2011) 589–593. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e318228c136>.
- [6] B.E. Jones, K.R. Tovar, A. Goehring, F. Jalali-Yazdi, N.J. Okada, E. Gouaux, G.L. Westbrook, Autoimmune receptor encephalitis in mice induced by active immunization with conformationally stabilized holoreceptors, *Sci Transl Med.* 11 (2019) eaaw0044. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw0044>.
- [7] I. Wagnon, P. Hélie, I. Bardou, C. Regnaud, L. Leseq, J. Leprince, M. Naveau, B. Delaunay, O. Toutirais, B. Lemauff, O. Etard, D. Vivien, V. Agin, R. Macrez, E. Maubert, F. Docagne, Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against N-methyl-d-aspartate receptor, *Brain.* (2020). <https://doi.org/10.1093/brain/awaa250>.
- [8] D.P. McCarthy, J.W.-T. Yap, C.T. Harp, W.K. Song, J. Chen, R.M. Pearson, S.D. Miller, L.D. Shea, An antigen-encapsulating nanoparticle platform for TH1/17 immune tolerance therapy, *Nanomedicine.* 13 (2017) 191–200. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2016.09.007>.
- [9] R.M. Pearson, J.R. Podojil, L.D. Shea, N.J.C. King, S.D. Miller, D.R. Getts, Overcoming challenges in treating autoimmunity: Development of tolerogenic immune-modifying nanoparticles, *Nanomedicine.* 18 (2019) 282–291. <https://doi.org/10.1016/j.nano.2018.10.001>.
- [10] E.G. Hughes, X. Peng, A.J. Gleichman, M. Lai, L. Zhou, R. Tsou, T.D. Parsons, D.R. Lynch, J. Dalmau, R.J. Balice-Gordon, Cellular and synaptic mechanisms of anti-NMDA receptor encephalitis, *J. Neurosci.* 30 (2010) 5866–5875. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0167-10.2010>.
- [11] H.-G. Lee, J.-U. Lee, D.-H. Kim, S. Lim, I. Kang, J.-M. Choi, Pathogenic function of bystander-activated memory-like CD4<sup>+</sup> T cells in autoimmune encephalomyelitis, *Nat Commun.* 10 (2019) 709. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08482-w>.
- [12] Y. Sonobe, S. Jin, J. Wang, J. Kawanokuchi, H. Takeuchi, T. Mizuno, A. Suzumura, Chronological changes of CD4(+) and CD8(+) T cell subsets in the

- experimental autoimmune encephalomyelitis, a mouse model of multiple sclerosis, *Tohoku J Exp Med.* 213 (2007) 329–339.  
<https://doi.org/10.1620/tjem.213.329>.
- [13] S. Martinez-Pasamar, E. Abad, B. Moreno, N. Velez de Mendizabal, I. Martinez-Forero, J. Garcia-Ojalvo, P. Villoslada, Dynamic cross-regulation of antigen-specific effector and regulatory T cell subpopulations and microglia in brain autoimmunity, *BMC Syst Biol.* 7 (2013) 34. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-34>.
- [14] C. Steckner, A. Weber, A.K. Mausberg, M. Heininger, F. Opdenhövel, B.C. Kieseier, H.P. Hartung, H.H. Hofstetter, Alteration of the cytokine signature by various TLR ligands in different T cell populations in MOG37-50 and MOG35-55-induced EAE in C57BL/6 mice, *Clin Immunol.* 170 (2016) 22–30.  
<https://doi.org/10.1016/j.clim.2016.05.008>.
- [15] H.H. Hofstetter, S.M. Ibrahim, D. Koczan, N. Kruse, A. Weishaupt, K.V. Toyka, R. Gold, Therapeutic efficacy of IL-17 neutralization in murine experimental autoimmune encephalomyelitis, *Cell Immunol.* 237 (2005) 123–130.  
<https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2005.11.002>.
- [16] L.-M. Dao, M.-L. Machule, P. Bacher, J. Hoffmann, L.-T. Ly, F. Wegner, A. Scheffold, H. Prüss, Decreased inflammatory cytokine production of antigen-specific CD4+ T cells in NMDA receptor encephalitis, *J Neurol.* 268 (2021) 2123–2131. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10371-y>.
- [17] M.S. Weber, T. Prod'homme, J.C. Patarroyo, N. Molnarfi, T. Karnezis, K. Lehmann-Horn, D.M. Danilenko, J. Eastham-Anderson, A.J. Slavin, C. Linington, C.C.A. Bernard, F. Martin, S.S. Zamvil, B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity, *Ann Neurol.* 68 (2010) 369–383.  
<https://doi.org/10.1002/ana.22081>.
- [18] N. Molnarfi, U. Schulze-Topphoff, M.S. Weber, J.C. Patarroyo, T. Prod'homme, M. Varrin-Doyer, A. Shetty, C. Linington, A.J. Slavin, J. Hidalgo, D.E. Jenne, H. Wekerle, R.A. Sobel, C.C.A. Bernard, M.J. Shlomchik, S.S. Zamvil, MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies, *J Exp Med.* 210 (2013) 2921–2937.  
<https://doi.org/10.1084/jem.20130699>.
- [19] A.C. Lino, T. Dörner, A. Bar-Or, S. Fillatreau, Cytokine-producing B cells: a translational view on their roles in human and mouse autoimmune diseases, *Immunol Rev.* 269 (2016) 130–144. <https://doi.org/10.1111/imr.12374>.
- [20] C. Malmeström, B.A. Andersson, S. Haghghi, J. Lycke, IL-6 and CCL2 levels in CSF are associated with the clinical course of MS: implications for their possible immunopathogenic roles, *J Neuroimmunol.* 175 (2006) 176–182.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2006.03.004>.
- [21] E.R. Pierson, I.M. Stromnes, J.M. Goverman, B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the central nervous system, *J Immunol.* 192 (2014) 929–939.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.1302171>.
- [22] M. Mitsdoerffer, Y. Lee, A. Jäger, H.-J. Kim, T. Korn, J.K. Kolls, H. Cantor, E. Bettelli, V.K. Kuchroo, Proinflammatory T helper type 17 cells are effective B-cell helpers, *Proc Natl Acad Sci U S A.* 107 (2010) 14292–14297.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1009234107>.
- [23] A. Peters, L.A. Pitcher, J.M. Sullivan, M. Mitsdoerffer, S.E. Acton, B. Franz, K. Wucherpfennig, S. Turley, M.C. Carroll, R.A. Sobel, E. Bettelli, V.K. Kuchroo,



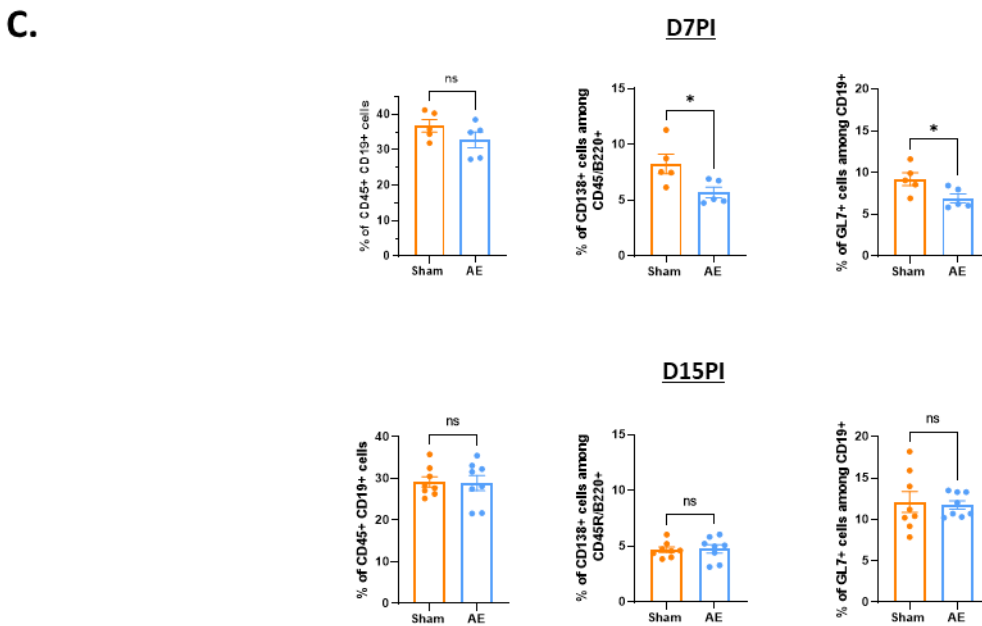
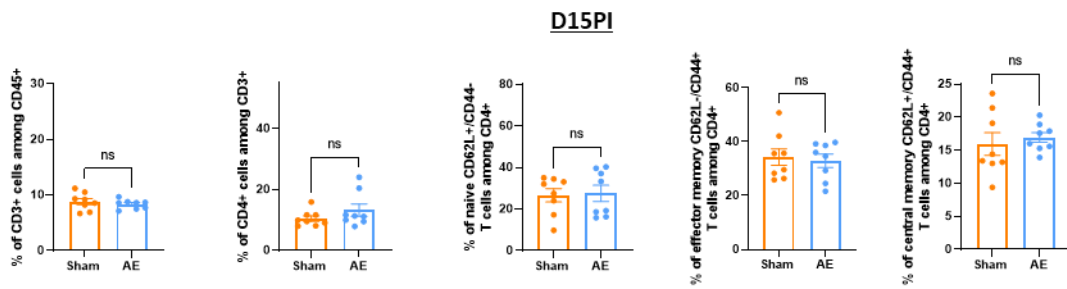
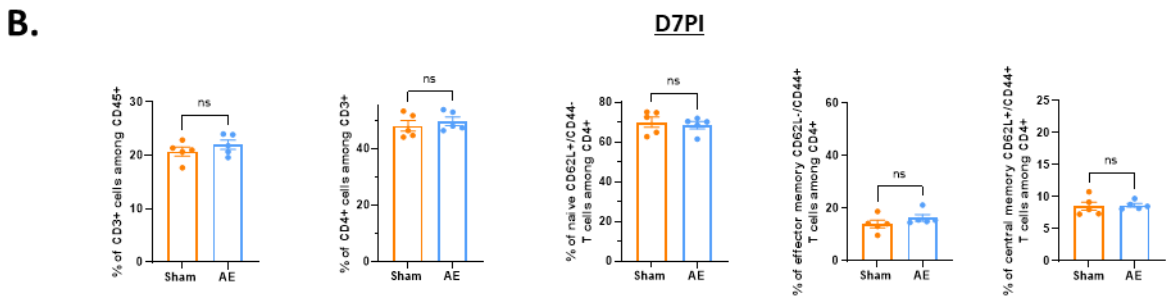
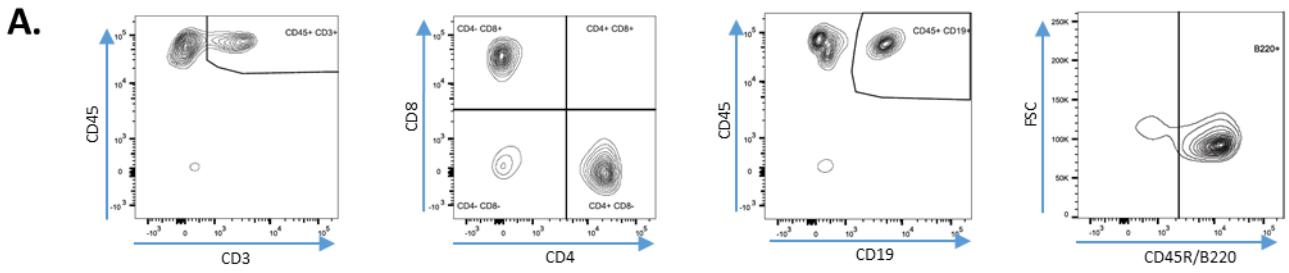
- Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation, *Immunity*. 35 (2011) 986–996.  
<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2011.10.015>.
- [24] J. Guo, C. Zhao, F. Wu, L. Tao, C. Zhang, D. Zhao, S. Yang, D. Jiang, J. Wang, Y. Sun, Z. Li, H. Li, K. Yang, T Follicular Helper-Like Cells Are Involved in the Pathogenesis of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, *Front Immunol*. 9 (2018) 944. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00944>.
- [25] J.L. Quinn, G. Kumar, A. Agasing, R.M. Ko, R.C. Axtell, Role of TFH Cells in Promoting T Helper 17-Induced Neuroinflammation, *Front Immunol*. 9 (2018) 382. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00382>.
- [26] J.R. Moffitt, E. Lundberg, H. Heyn, The emerging landscape of spatial profiling technologies, *Nat Rev Genet*. (2022). <https://doi.org/10.1038/s41576-022-00515-3>.
- [27] M. Pohl, M.-T. Fischer, S. Mader, K. Schanda, M. Kitic, R. Sharma, I. Wimmer, T. Misu, K. Fujihara, M. Reindl, H. Lassmann, M. Bradl, Pathogenic T cell responses against aquaporin 4, *Acta Neuropathol*. 122 (2011) 21–34.  
<https://doi.org/10.1007/s00401-011-0824-0>.
- [28] D. Sun, J.N. Whitaker, Z. Huang, D. Liu, C. Coleclough, H. Wekerle, C.S. Raine, Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice, *J Immunol*. 166 (2001) 7579–7587.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7579>.
- [29] M. Bettini, K. Rosenthal, B.D. Evavold, Pathogenic MOG-reactive CD8+ T cells require MOG-reactive CD4+ T cells for sustained CNS inflammation during chronic EAE, *J Neuroimmunol*. 213 (2009) 60–68.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.05.017>.
- [30] C.A. Wagner, P.J. Roqué, T.R. Mileur, D. Liggitt, J.M. Goverman, Myelin-specific CD8+ T cells exacerbate brain inflammation in CNS autoimmunity, *J Clin Invest*. 130 (2020) 203–213. <https://doi.org/10.1172/JCI132531>.
- [31] C.B. Smarr, W.T. Yap, T.P. Neef, R.M. Pearson, Z.N. Hunter, I. Ifergan, D.R. Getts, P.J. Bryce, L.D. Shea, S.D. Miller, Biodegradable antigen-associated PLG nanoparticles tolerate Th2-mediated allergic airway inflammation pre- and postsensitization, *Proc Natl Acad Sci U S A*. 113 (2016) 5059–5064.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.1505782113>.
- [32] S. Prasad, T. Neef, D. Xu, J.R. Podojil, D.R. Getts, L.D. Shea, S.D. Miller, Tolerogenic Ag-PLG nanoparticles induce tregs to suppress activated diabetogenic CD4 and CD8 T cells, *J Autoimmun*. 89 (2018) 112–124.  
<https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.010>.
- [33] T.L. Freitag, J.R. Podojil, R.M. Pearson, F.J. Fokta, C. Sahl, M. Messing, L.C. Andersson, K. Leskinen, P. Saavalainen, L.I. Hoover, K. Huang, D. Phippard, S. Maleki, N.J.C. King, L.D. Shea, S.D. Miller, S.K. Meri, D.R. Getts, Gliadin Nanoparticles Induce Immune Tolerance to Gliadin in Mouse Models of Celiac Disease, *Gastroenterology*. 158 (2020) 1667-1681.e12.  
<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.045>.
- [34] Z. Hunter, D.P. McCarthy, W.T. Yap, C.T. Harp, D.R. Getts, L.D. Shea, S.D. Miller, A biodegradable nanoparticle platform for the induction of antigen-specific immune tolerance for treatment of autoimmune disease, *ACS Nano*. 8 (2014) 2148–2160. <https://doi.org/10.1021/nn405033r>.
- [35] R.M. Pearson, L.M. Casey, K.R. Hughes, L.Z. Wang, M.G. North, D.R. Getts, S.D. Miller, L.D. Shea, Controlled Delivery of Single or Multiple Antigens in



- Tolerogenic Nanoparticles Using Peptide-Polymer Bioconjugates, *Mol Ther.* 25 (2017) 1655–1664. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.04.015>.
- [36] J.J. Lochhead, R.G. Thorne, Intranasal delivery of biologics to the central nervous system, *Adv Drug Deliv Rev.* 64 (2012) 614–628. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2011.11.002>.
- [37] S.M. Anderton, D.C. Wraith, Hierarchy in the ability of T cell epitopes to induce peripheral tolerance to antigens from myelin, *Eur J Immunol.* 28 (1998) 1251–1261. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4141\(199804\)28:04<1251::AID-IMMU1251>3.0.CO;2-O](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4141(199804)28:04<1251::AID-IMMU1251>3.0.CO;2-O).

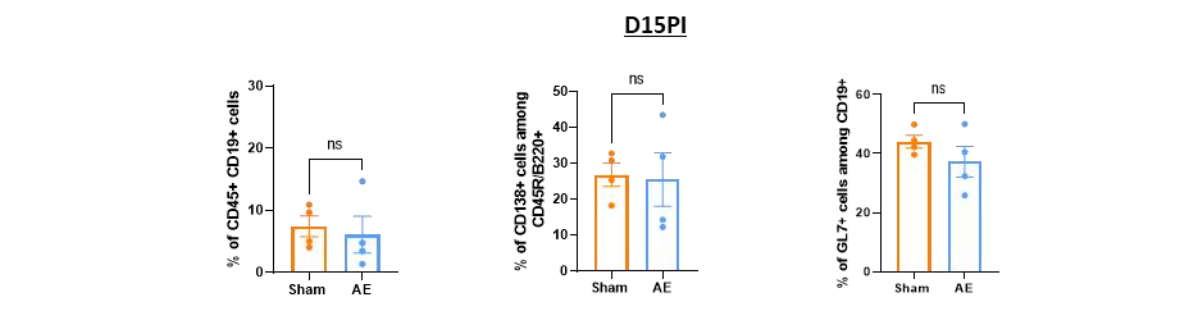
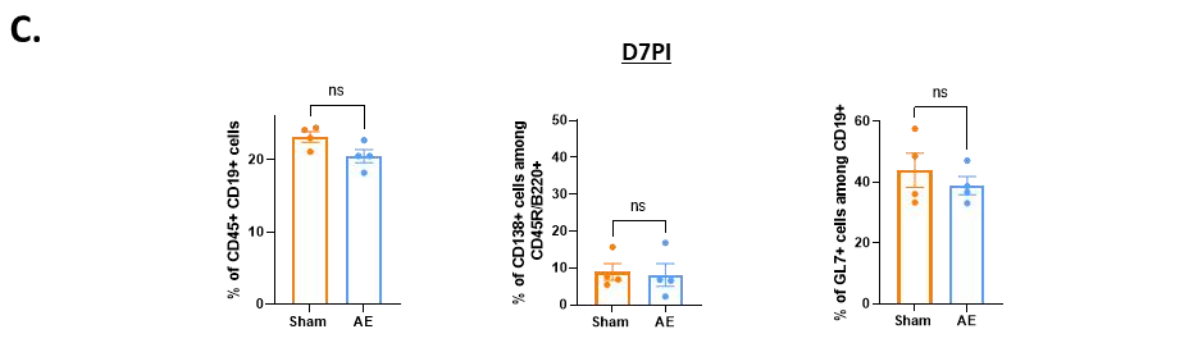
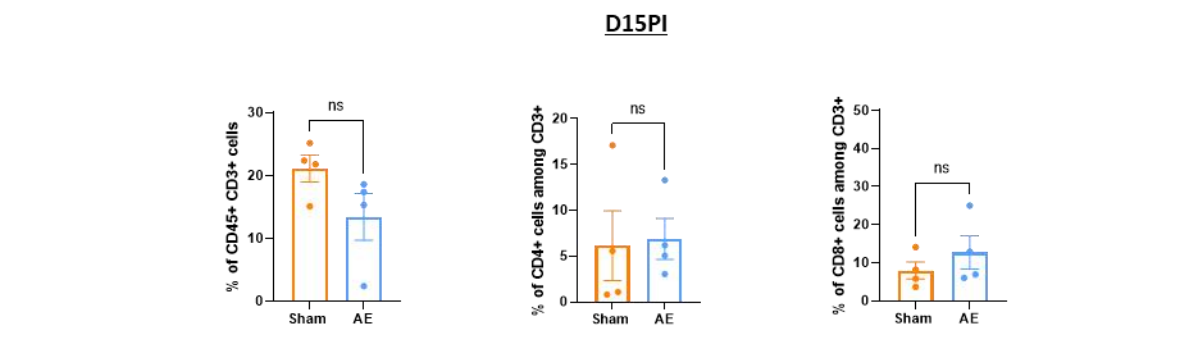
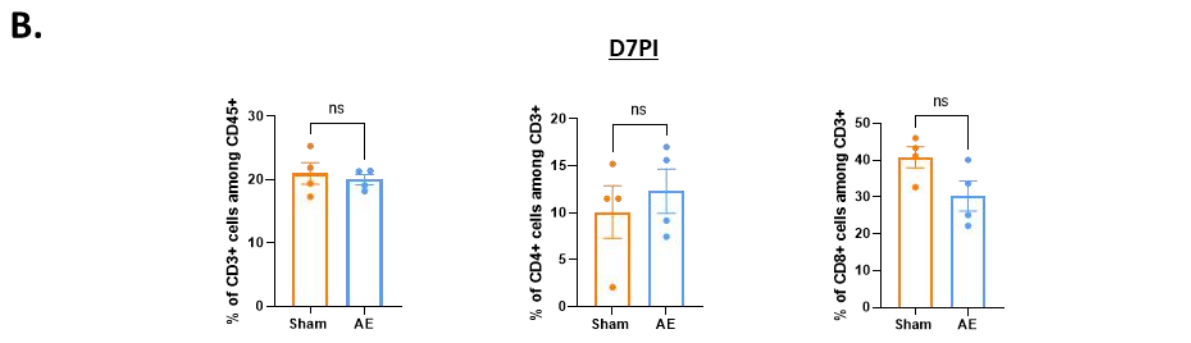
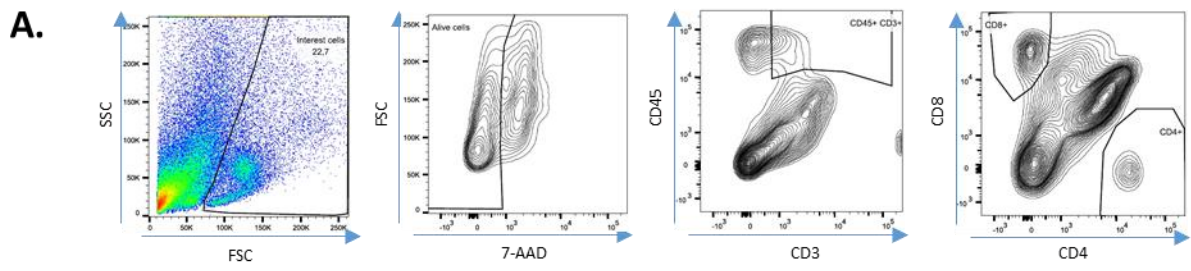


Figure 1



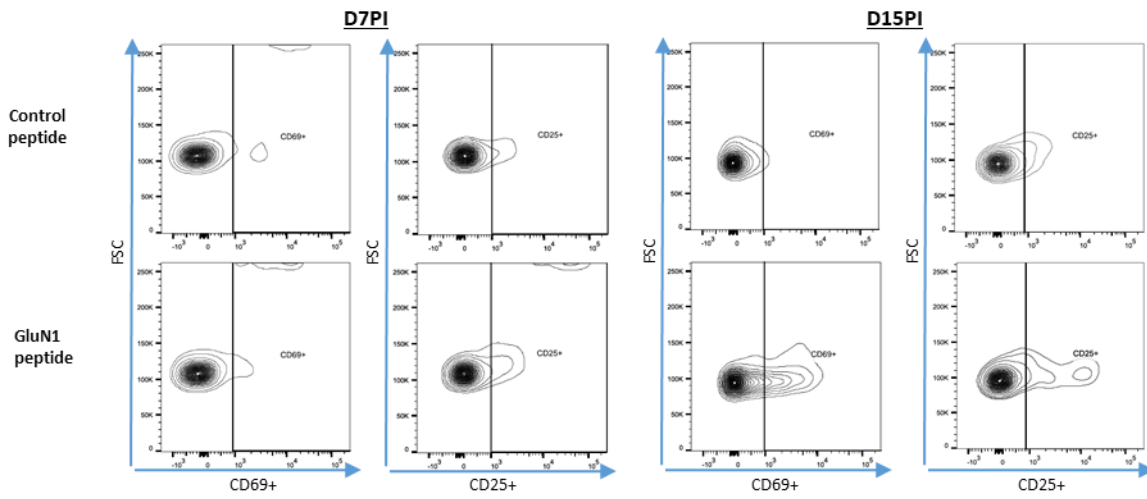
**Figure 1 : T and B cells in spleen after immunization with GluN1 peptide.** A, Representative gating strategy for leukocytes in the spleen. CD3<sup>+</sup> T cells and CD19<sup>+</sup> B cells were gated in CD45<sup>+</sup> leukocytes. B, Flow cytometry analysis of T cells 7 and 15 days post immunization. The memory profile of T CD4<sup>+</sup> cells was studied using CD44 and CD62L markers. C, Flow cytometry analysis of B cells 7 and 15 days post-immunization. The activated profile of B cells was studied using CD45/B220R and GL7 markers. Plasmocytes were analysed with CD138 marker. Data were expressed as percentage of parent cells (mean +/- SEM). Normality test were performed (Shapiro-Wilk test) before t-test. If normality could not be assumed a Mann-Whitney test was used (ns, non-significant ; \*p<0.05), n=5 (D7PI), n=8 (D15PI). PI, post-immunization.

Figure 2



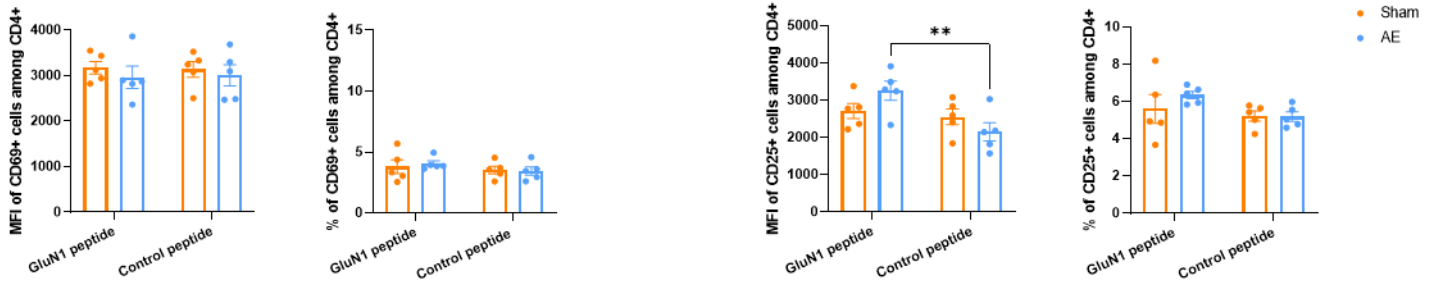
**Figure 2 : T and B cells in meninges after immunization with GluN1 peptide.** A, Representative gating strategy for leukocytes in the meninges. CD3<sup>+</sup> T cells were gated in viable (7-AAD negative) CD45<sup>+</sup> leukocytes. B, Flow cytometry analysis of T cells 7 and 15 days post-immunization. C, Flow cytometry analysis of B cells 7 and 15 days post-immunization. The activated profile of B cells was studied by CD45/B220R and GL7 markers. Plasmocytes were analysed with CD138 marker. Data were expressed as percentage of parent cells (mean +/- SEM). Normality test were performed (Shapiro-Wilk test) before t-test. If normality could not be assumed a Mann-Whitney test was used (ns, non-significant), n=4. PI, post-immunization.

A.

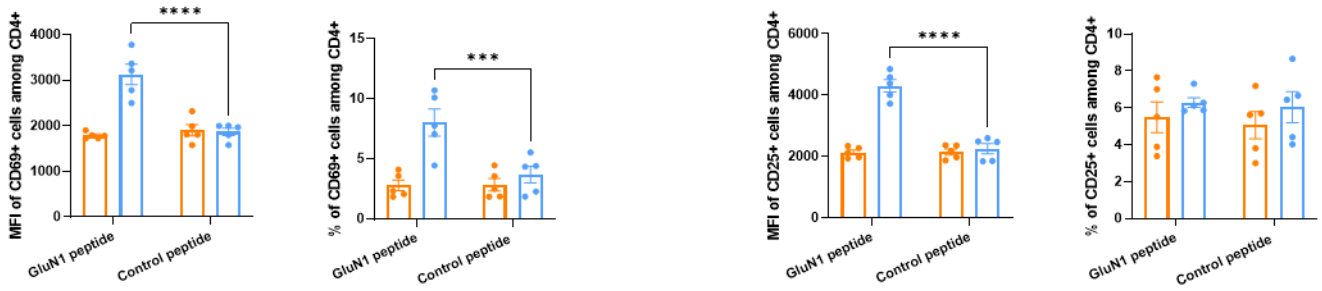


B.

D7PI

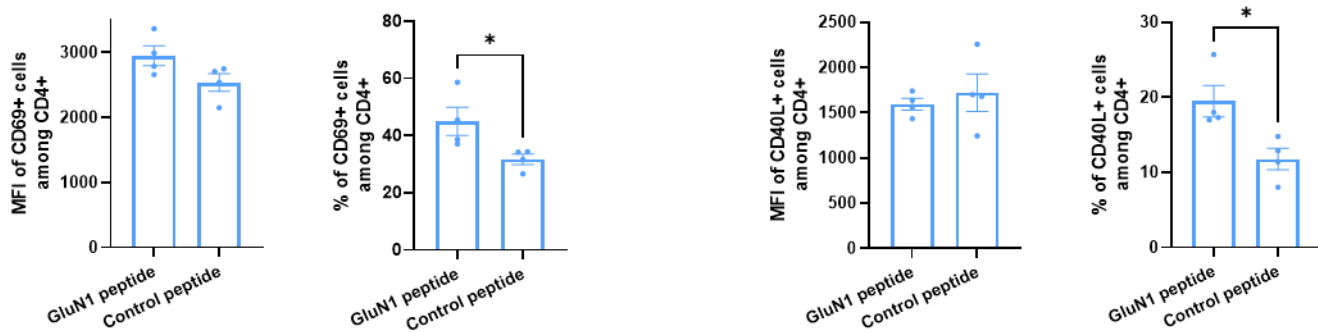


D15PI



C.

D15PI

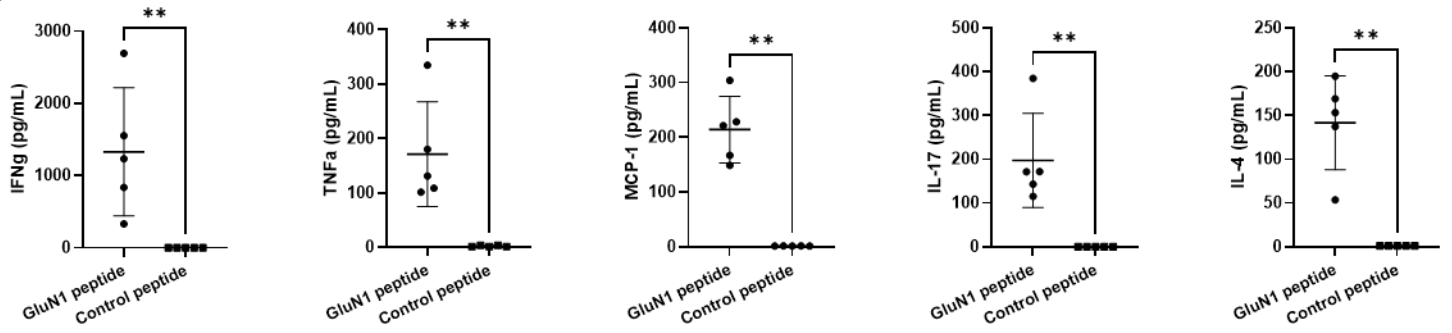


**Figure 3 : Activated CD4 T cell response to a specific reactivation.** Cells were cultured with GluN1 peptide (20µg/mL) specific reactivation or CLIP peptide (20µg/mL) as control, for 48 hours for spleen and 24 hours for meninges. A, Representative dot plots for activation markers CD69 and CD25 in CD4+ T cells. B, Flow cytometry analysis of CD4+ T cells cultured from spleen collected 7 and 15 days post-immunization using CD69 and CD25 markers. C, Flow cytometry analysis of CD4+ T cells cultured from the meninges of AE mice collected 7 and 15 days post-immunization using CD69 and CD40L markers. Median Fluorescence Intensity (MFI) and percentage of positive cells are represented (mean +/- SEM). Normality test were performed (Shapiro-Wilk test) before ANOVA test (spleen). If normality could not be assumed a Mann-Whitney test was used (meninges) (\*p<0.05 ; \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; \*\*\*\*p<0.0001), n=5 (spleen), n=4 (meninges). Orange : sham mice ; blue : AE mice.

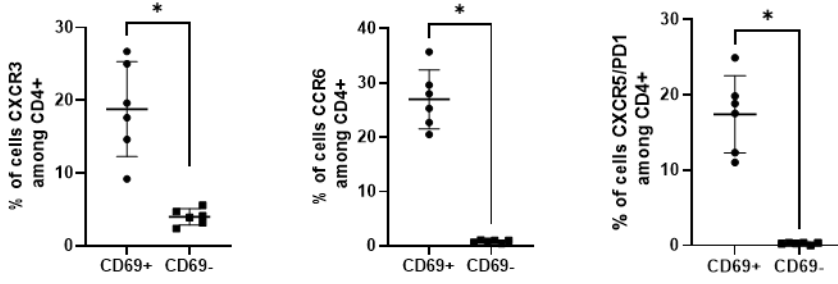


Figure 4

A.

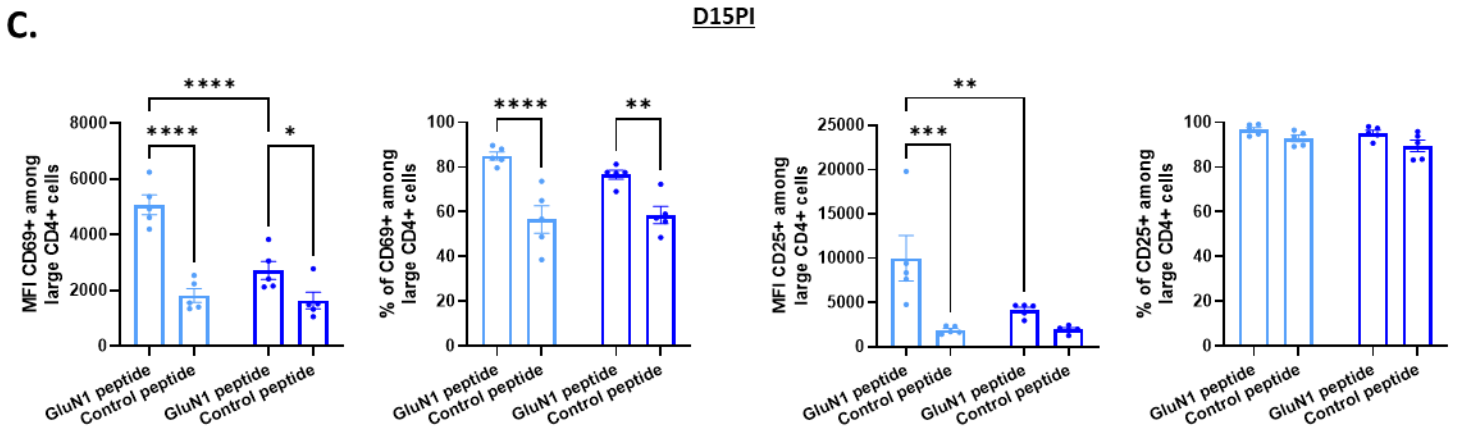
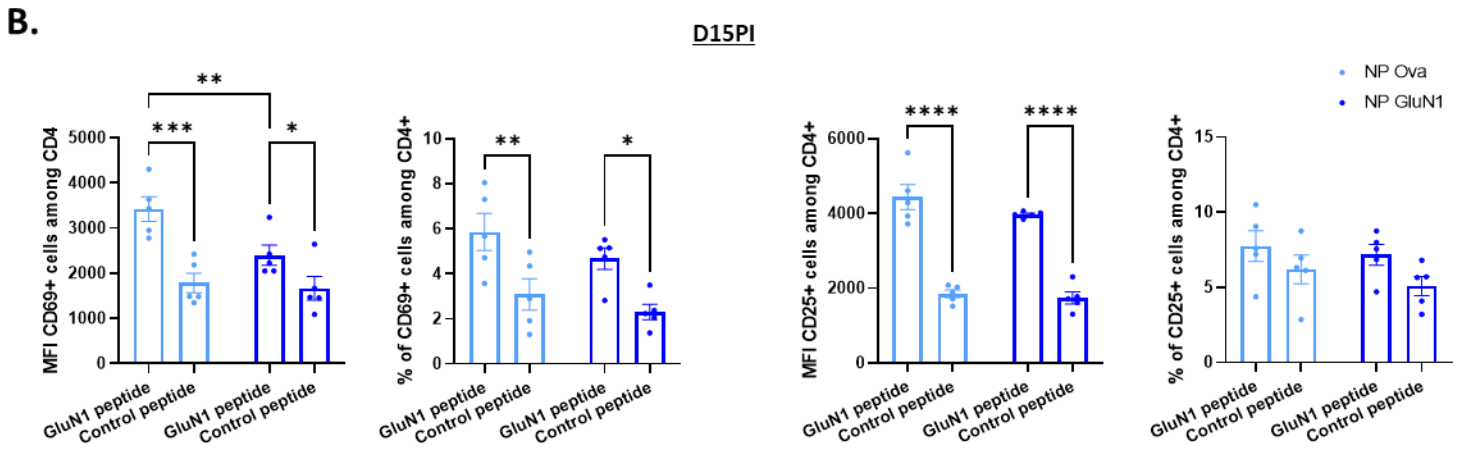
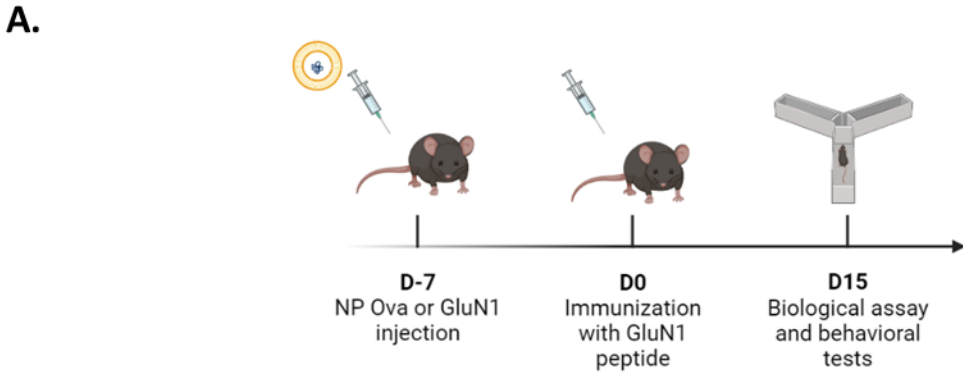


B.



**Figure 4 : Effect of GluN1 *in vitro* exposure on T cells isolated from mice 15 days post-immunization with GluN1 peptide.** A, Spleen cells were isolated 15 days post-immunization, cultured and reactivated with either GluN1 peptide or CLIP peptide (both 20µg/mL) for 48h before supernatants were collected and tested for cytokine production (n=5). B, T helper CD4+ T cells activated or not, CD69+ or CD69- respectively, were identified. Th1, Th17 and Th follicular cells were characterized by CXCR3, CCR6 and CXCR5/PD1 markers respectively (n=6). Data were expressed as mean +/- SD. Normality could not be assumed so non parametric Mann-Whitney test was used (\*p<0.05 ; \*\*p<0.01).

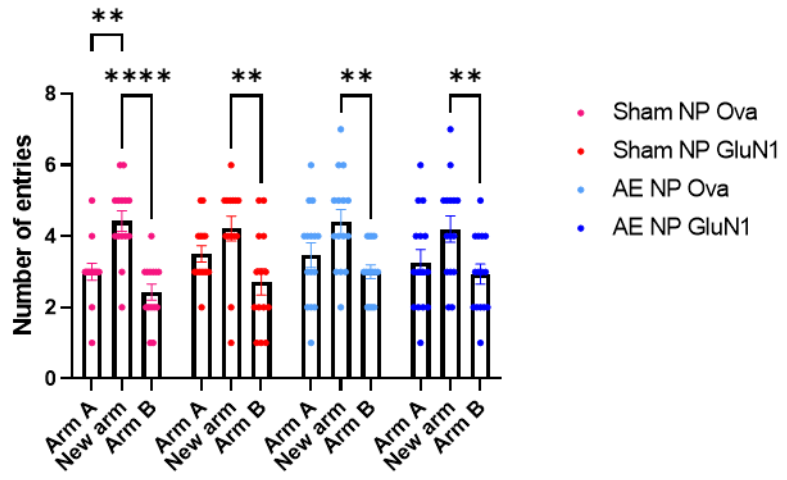
### Figure 5



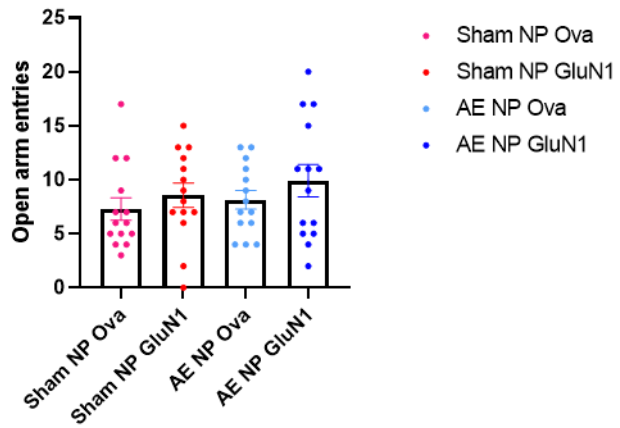
**Figure 5 : CD4+ T cell responses of mice immunized with GluN1 peptide after treatment with nanoparticles.** Splenocytes, from AE mice treated with ovalbumine nanoparticles (NP Ova) or GluN1 nanoparticles (NP GluN1) collected 15 days post-immunization, were reactivated *in vitro* with GluN1 or CLIP control peptide at 20µg/mL. A, Schematic experimental protocol. Mice received nanoparticles loaded with GluN1 or Ovalbumine peptide 7 days before peptide immunization and comportemental tests were performed 15 days after immunization. B, Total activated CD4+ T cells are identified with CD25 and CD69 and Median Fluorescence Intensity (MFI) and percentage of parent cells are represented. C, Activated CD4+ T cells in large cells. Data were expressed as mean +/- SEM, Normality test were performed (Shapiro-Wilk test) before ANOVA test (\*p<0.05 ; \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; \*\*\*\*p<0.0001), n=5.

Figure 6

A.



B.



**Figure 6 : Effect of nanoparticles injection on comportemental tests.** A, Number of entries during the recall phase for Y-maze test. B, Number of entries into the open arm during O-maze test. Data were expressed as mean +/- SEM. Normality test were performed (Shapiro-Wilk test) before ANOVA test (\*\* $p < 0.01$  ; \*\*\*\* $p < 0.0001$ ),  $n = 14$  (Sham, NP GluN1 and Ova) and  $n = 15$  (AE, NP GluN1 and Ova).

**Table 1**

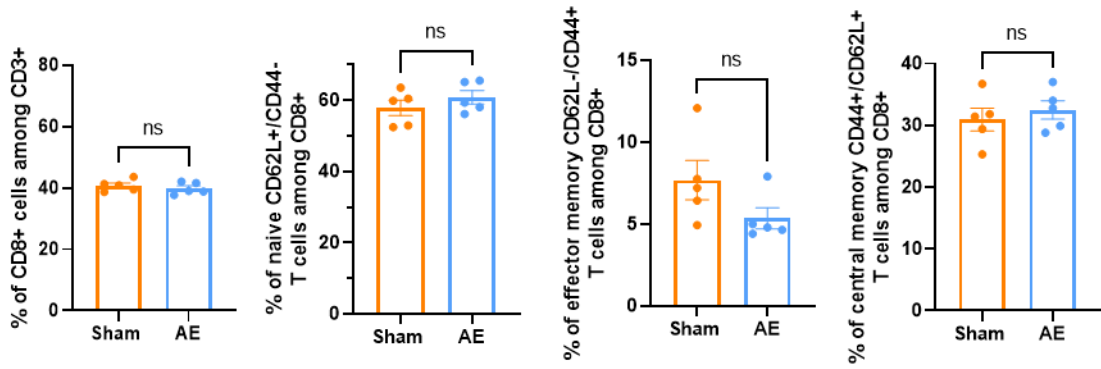
Antigen	mg particles	Z-avg Diameter (nm)	Main Peak (nm)	Zeta potential (mV)	Encapsulation (ug peptide / mg particle)
GluN1 359-378	99,9	606,4	413.9+/-104.1	-75.8+/-7.36	3.306+/-0.3653
Ova 323-339	104,8	810,4	735+/-346.9	-85.9+/-8.49	34.21+/-10.39

**Table 1 : Characterization of nanoparticle formulations.** Nanoparticles were prepared with GluN1 peptide and Ovalbumine peptide.

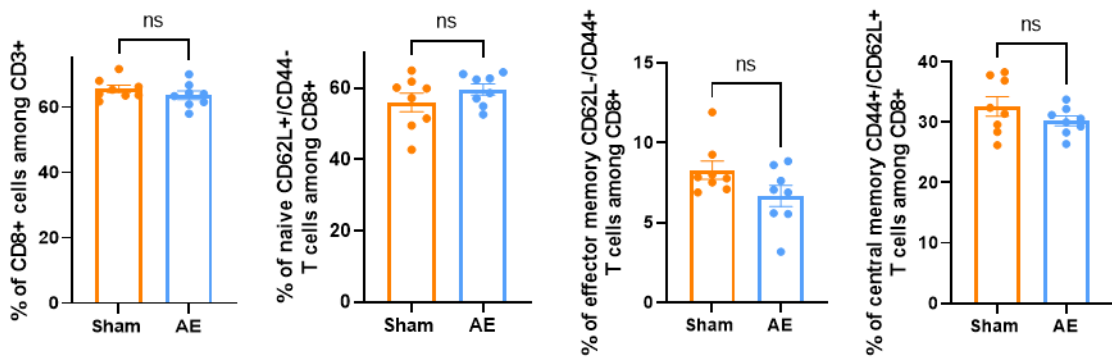


## Supplementary figure 1

### D7PI



### D15PI

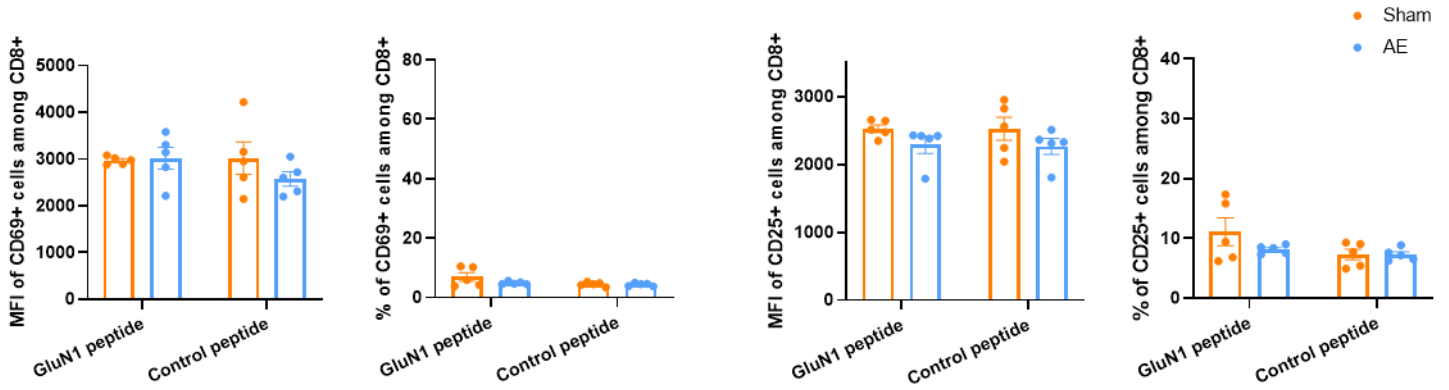


**Supplementary 1 : CD8+ T cells in spleen after immunization with GluN1 peptide.**

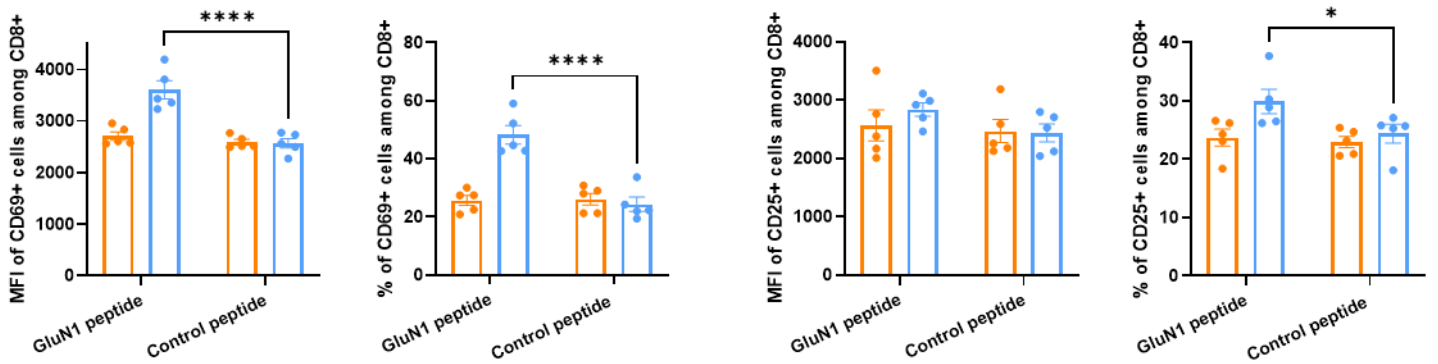
Flow cytometry analysis of CD8+ T cells 7 and 15 days post-immunization. The memory profile of CD8+ T cells was studied using CD44 and CD62L markers. Data were expressed as percentage of parent cells (mean +/- SEM). Normality test were performed (Shapiro-Wilk test) before t-test (ns, non-significant), n=5 (D7PI), n=8 (D15PI). PI, post-immunization.

## Supplementary figure 2

D7PI

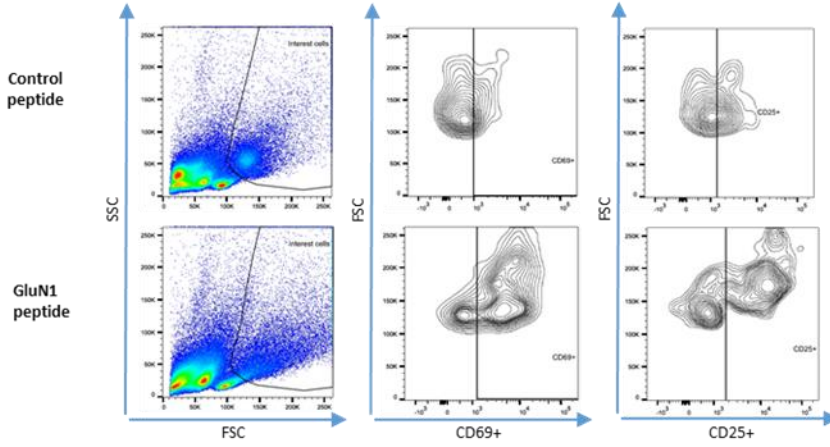


D15PI

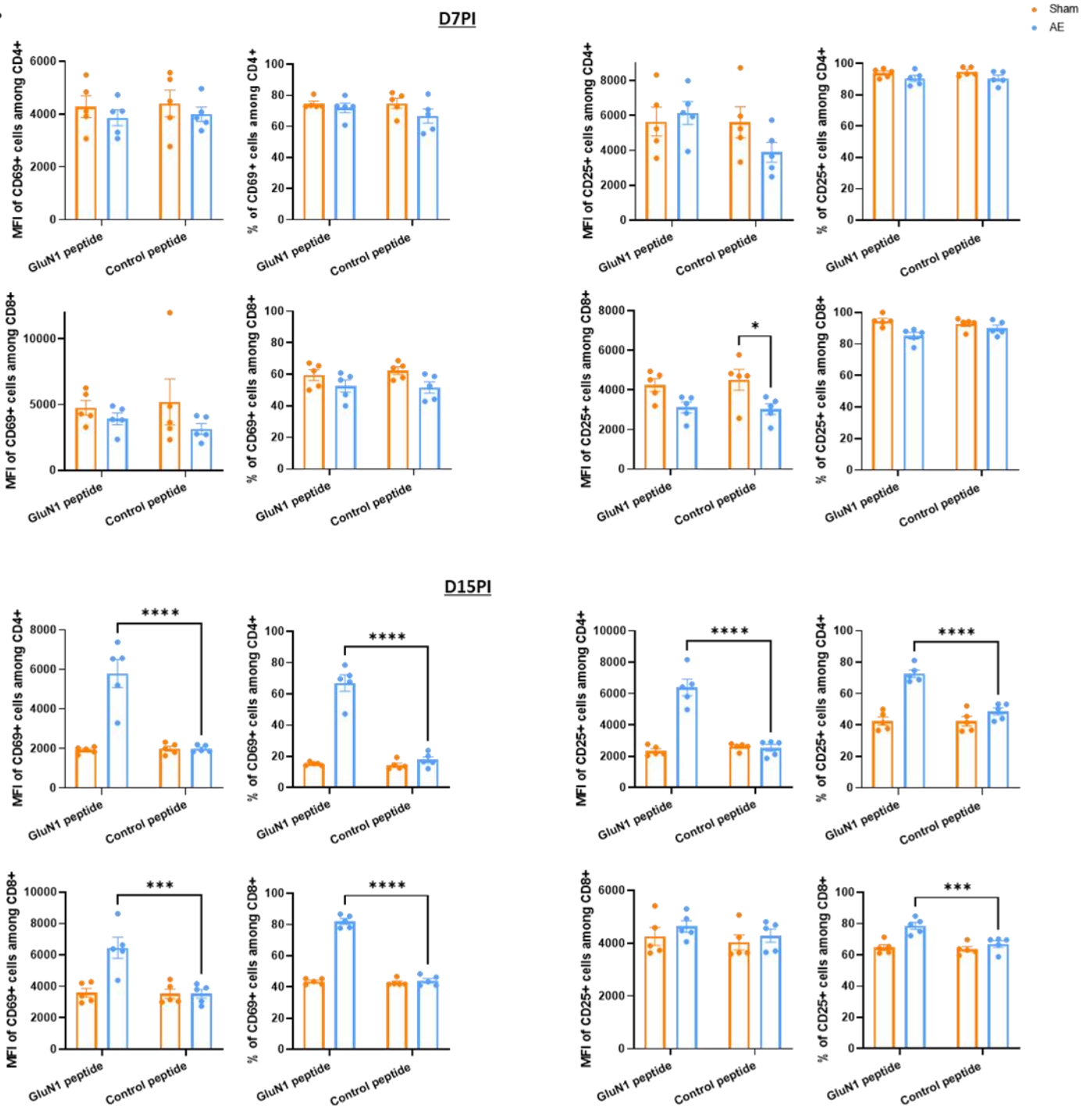


**Supplementary 2 : Activated CD8+ T cell response to a specific reactivation.** Cells from spleen were cultured with GluN1 peptide (20µg/mL) or CLIP peptide (20µg/mL) as control, for 48 hours. Flow cytometry analysis 7 and 15 days post-immunization using CD69 and CD25 markers. Median Fluorescence Intensity (MFI) and percentage of positive cells are represented (mean +/- SEM). Normality test were performed (Shapiro-Wilk test) before ANOVA test (\*p<0.05 ; \*\*\*\*p<0.0001), n=5. PI, post-immunization.

**A.**



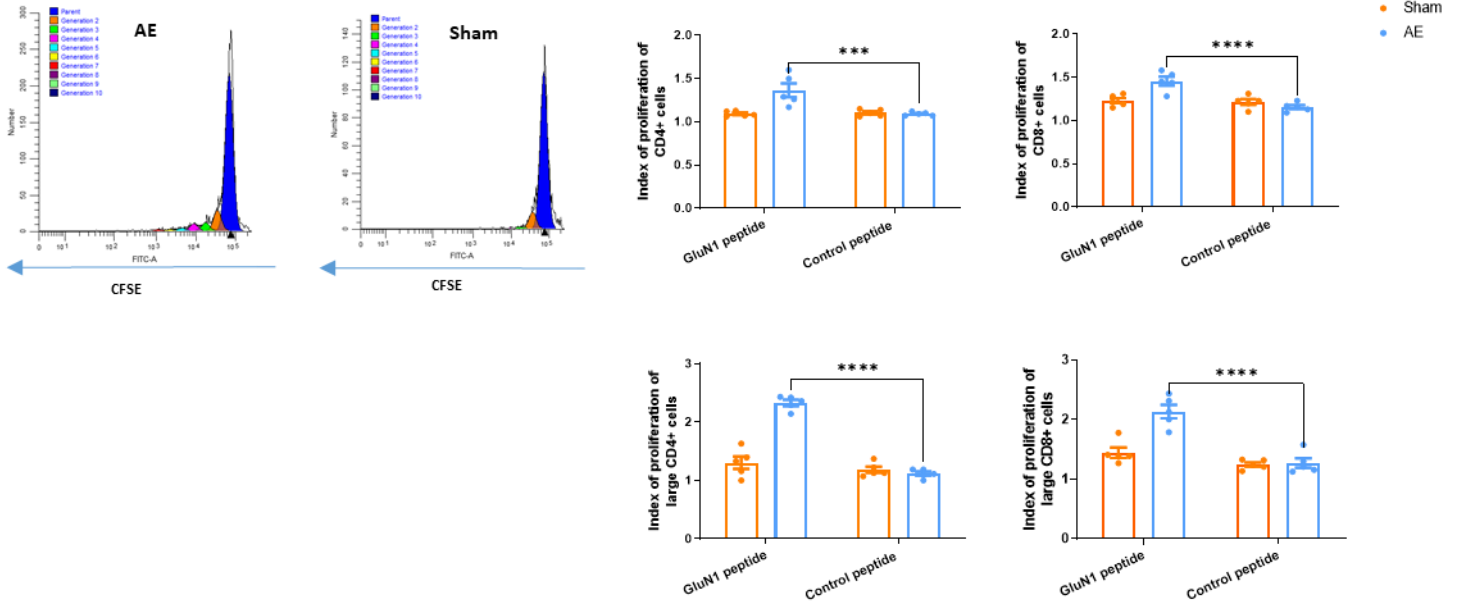
**B.**



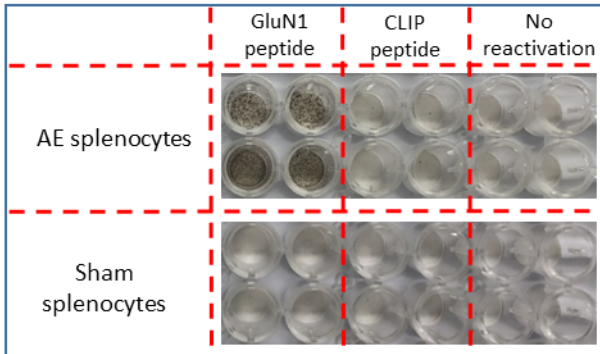
**Supplementary 3 : Large activated CD4+ and CD8+ T cell response to a specific reactivation.** Cells, from spleen collected 7 and 15 days post-immunization were cultured with GluN1 peptide (20µg/mL) or CLIP peptide (20µg/mL) as control, for 48 hours. A, Gating strategy for activation markers CD69 and CD25 in CD4+ and CD8+ T cells. B, Flow cytometry analysis of CD4+ and CD8+ T cells using CD69 and CD25 markers. Median Fluorescence Intensity (MFI) and percentage of positive cells are represented (mean +/- SEM). Normality test were performed (Shapiro-Wilk test) before ANOVA test (\*p<0.05 ; \*\*\*p<0.001 ; \*\*\*\*p<0.0001), n=5. PI, post-immunization.

## Supplementary figure 4

A.



B.

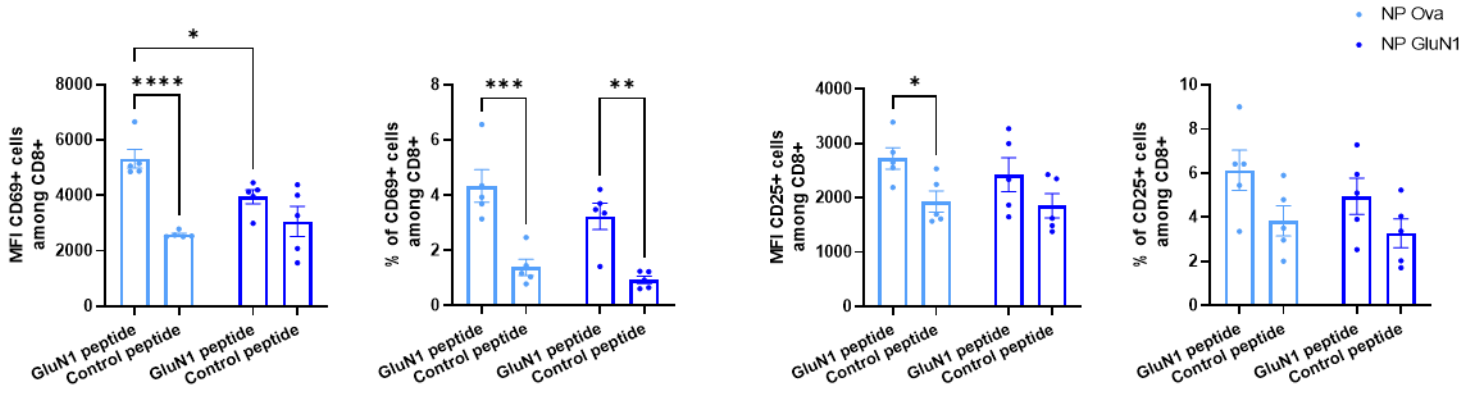


**Supplementary 4 : Specificity of T cell response after reactivation with GluN1 peptide in splenocytes.** A, Flow cytometry analysis of T cells proliferation. Cells collected 15 days post-immunization were labelled with CFSE and cultured with GluN1 peptide (20µg/mL) or CLIP peptide (20µg/mL) as control, for 4 days (n=5). B, Splenocytes collected 15 days post immunization were cultured with GluN1 or CLIP peptide (both 20µg/mL) during 10 days with IL-2. IFN-γ production is determined by ELISpot assay after stimulation with GluN1 or CLIP peptide (both 20µg/mL) (n=2). Data were expressed as percentage of parent cells (mean +/- SEM). Normality test were performed (Shapiro-Wilk test) before ANOVA test (\*\*\*\*p<0.0001).

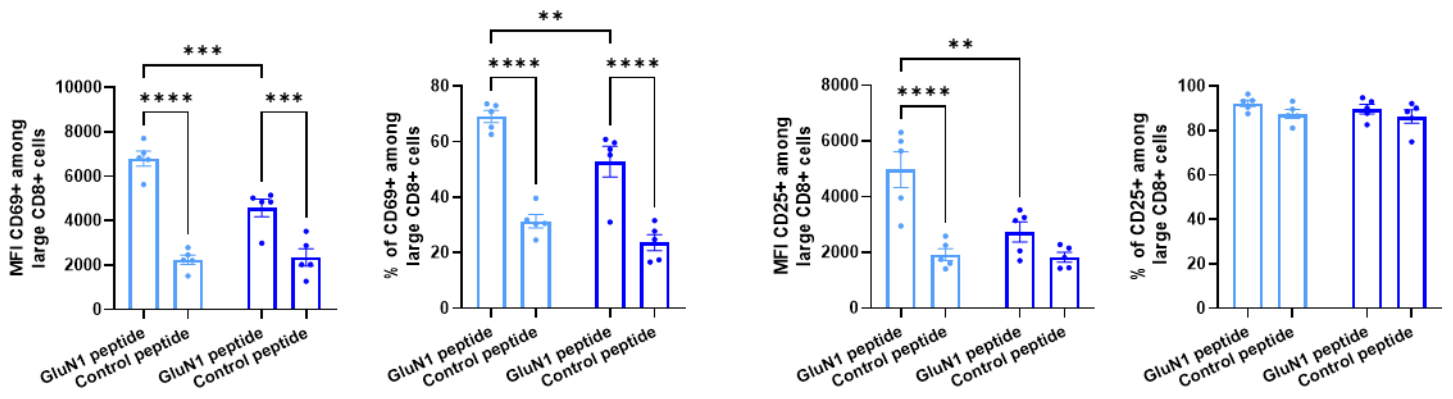


### Supplementary figure 5

A.



B.



**Supplementary 5 : CD8+ T cell responses of mice immunized with GluN1 peptide after treatment with nanoparticles.** Splenocytes, from AE mice treated with ovalbumine nanoparticles (NP ova) or GluN1 nanoparticles (NP GluN1) collected 15 days post-immunization, were reactivated *in vitro* with GluN1 or CLIP control peptide at 20µg/mL. A, Total activated CD8+ T cells are identified with CD25 and CD69 and Median Fluorescence Intensity (MFI) and percentage of parent cells are represented. B, Activated CD8+ T cells in large cells. Data were expressed with mean +/- SEM, Normality test were performed (Shapiro-Wilk test) before ANOVA test (\*p<0.05 ; \*\*p<0.01 ; \*\*\*p<0.001 ; \*\*\*\*p<0.0001), n=5.



## **IV. DISCUSSION**



## Discussion

L'EA à Ac anti-NMDAR est une pathologie autoimmune responsable de troubles neurologiques et psychiatriques invalidants et dont les séquelles altèrent la qualité de vie des patients (Dalmou 2016). Chez les patients, les auto-Ac vont cibler la sous-unité GluN1 du NMDAR causant ainsi les symptômes observés. Plusieurs modèles murins ont été mis en place afin d'améliorer la compréhension de cette maladie. Notre laboratoire a développé un modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR dans lequel est observé une production d'Ac spécifiques de la sous-unité GluN1 du NMDAR ainsi qu'une infiltration de lymphocytes B dans le SNC (Wagnon et al. 2020). Afin de mieux comprendre les mécanismes immunologiques à l'origine de la formation d'auto-Ac, le premier objectif de travail de thèse a été de caractériser la réponse lymphocytaire T dans notre modèle. Dans une seconde partie, nous avons mis en place une stratégie d'immunothérapie tolérogène à l'aide de NP dans le modèle.

### 1. La réponse lymphocytaire dans le modèle EA à Ac anti-NMDAR

L'étude *ex vivo* à J7 et J15 post-immunisation avec le peptide GluN1, dans les splénocytes des animaux ne nous a pas permis de mettre en évidence une différence quantitative au sein des populations T et B globales, en comparaison avec les souris « sham ». Ce résultat peut s'expliquer par le fait que la fréquence des lymphocytes T et B spécifiques de GluN1 est très faible parmi la population cellulaire étudiée. Cependant, des effets cinétiques ont été observés pour les populations lymphocytaires. Tout d'abord, nous montrons une diminution des lymphocytes T CD4 totaux et une augmentation des T CD8 entre 7 et 15 jours post-immunisation dans la rate. Parmi notre population lymphocytaire T se trouve une population de doubles

négatifs (DN), n'étant ni CD4 ni CD8 (Wu et al. 2022). Cette population, qui reste à caractériser, pourrait correspondre à des lymphocytes T non conventionnels présentant un TCR $\gamma\delta$  mais également à des NK-T (natural killer T) identifiables par les marqueurs NK1.1, NKG2D ou Ly49a (Simoni et al. 2012). D'autre part, toujours dans la rate, les proportions de cellules naïves et mémoires CD4 évoluent et à J15 après l'immunisation avec le peptide GluN1. Nous avons remarqué que la proportion de cellules naïves avait fortement diminuée comparé au 7<sup>e</sup> jour post-immunisation, et que celles des cellules mémoires effectrices et centrales avaient augmentée. Lee et collaborateurs ont montré un effet « bystander » des lymphocytes T CD4 mémoires, non spécifiques de l'Ag, qui participent au développement de la pathologie dans le modèle EAE, par amplification des cytokines pro-inflammatoires IL-17A, IFN- $\gamma$  et GM-CSF (H.-G. Lee et al. 2019). De manière hypothétique, les cellules mémoires que nous avons observées pourraient aussi participer au développement de la pathologie dans notre modèle. Étonnement, un « switch » des cellules naïves vers les cellules mémoires pour les lymphocytes T CD8 n'est pas retrouvé. Il serait intéressant de vérifier ces données avec d'autres marqueurs de lymphocytes T CD8 mémoires tels que Ly6C et CD25 (Carrio, Bathe, et Malek 2004). Enfin, au niveau des méninges, les résultats montrent une diminution des lymphocytes T CD4 et CD8, ainsi qu'une diminution des lymphocytes B CD19 mais une augmentation des plasmocytes CD138 à J15 post-immunisation. Dans l'ensemble, ces effets cinétiques évoquent l'hypothèse d'un effet des adjuvants, CFA et/ou toxine pertussique, utilisés lors de l'immunisation des animaux. Afin de connaître l'effet global des adjuvants, un phénotypage des lymphocytes T et B, dans la rate et les méninges, à J0 serait à réaliser pour obtenir une cinétique complète de l'évolution de ces populations lymphocytaires.

La mise en évidence de lymphocytes T spécifiques au sein des splénocytes et des cellules issues des méninges a été faite suite à la réactivation *in vitro* avec le peptide GluN1. Le niveau d'expression (identifié par l'intensité moyenne de fluorescence, MFI) et parfois le pourcentage des marqueurs d'activation CD69, CD25 et CD40L sont augmentés en présence de l'Ag. Nous avons mis en évidence que la présence de lymphocytes T spécifiques est nettement plus marquée à J15 qu'à J7 post-immunisation. Des prémices d'activation sont visibles à J7 post-immunisation avec une augmentation de l'expression du marqueur CD25. Nos résultats sont en accord avec ce qui a été observé dans le modèle EAE, un autre modèle de neuroinflammation impliquant les lymphocytes T CD4. Une étude de la cinétique des profils cellulaires dans ce modèle EAE montre un pic de lymphocytes T CD4 12 jours après l'immunisation des animaux, retrouvé aussi pour leur prolifération (Sonobe *et al.* 2007). Une autre étude dans ce même modèle EAE, fait état d'un pic de l'augmentation des lymphocytes T effecteurs, identifiés à l'aide de tétramère et du marqueur CD69, plus précoce, vers 7 à 8 jours après l'immunisation (Martinez-Pasamar *et al.* 2013). Toutefois, ces données ont été réalisées sur un faible échantillon (n=3) et montrent une variabilité interindividuelle importante.

La mise en évidence de lymphocytes T spécifiques est aussi validée par les données de production de cytokines des splénocytes après réactivation spécifique avec le peptide GluN1. Le profil de production de cytokines par les lymphocytes T CD4 spécifiques, cohérent avec celui des récepteurs de chemokines, est de type polyfonctionnel avec la présence de lymphocytes Th1, Th17 et Th2/Tfh et comparable avec celui observé dans l'EAE. Par exemple, Sonobe et collaborateurs ont montré qu'à 12 jours post-immunisation, une forte production des cytokines IFN- $\gamma$  et TNF- $\alpha$  est observée dans le modèle EAE (Sonobe *et al.* 2007). L'IL-4 est quant à elle produite

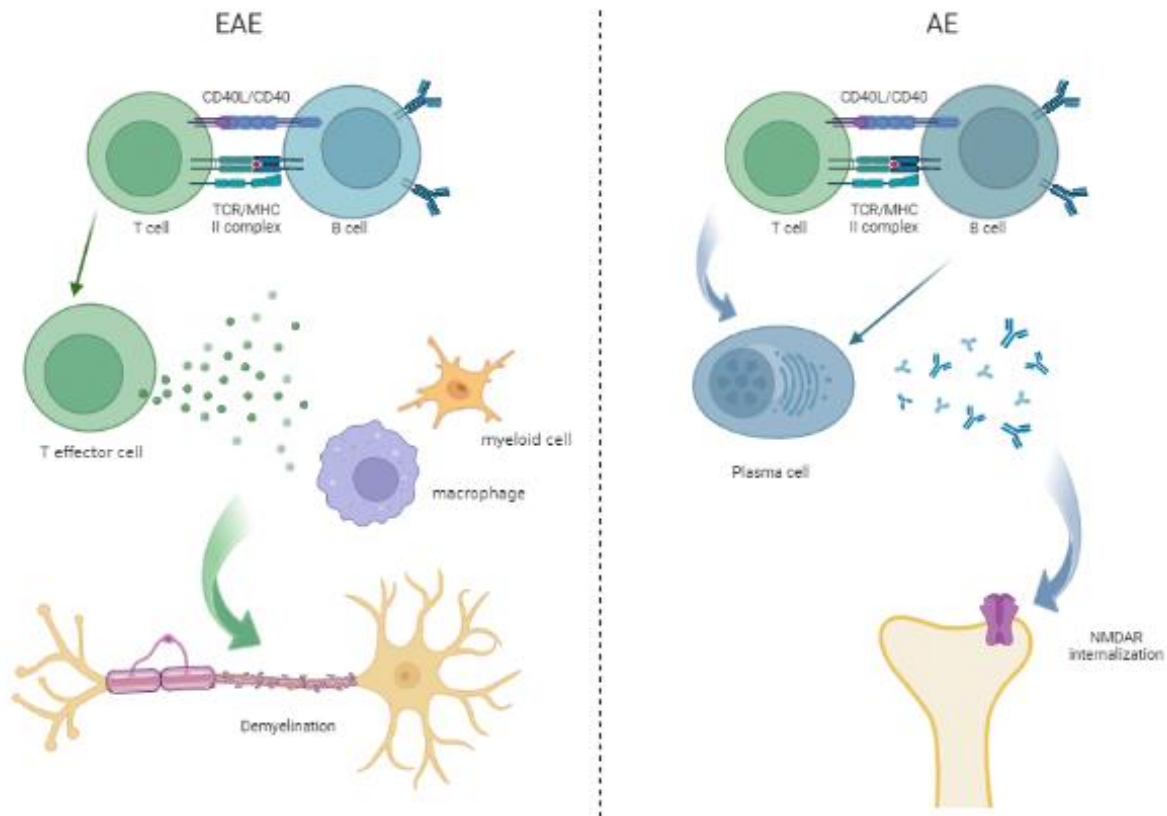


plus tôt, soit au 6<sup>e</sup> jour suivant l'immunisation. La production d'IL-17 croit jusqu'à la déclaration des symptômes cliniques. Ceci renforce l'idée de la présence de lymphocytes T spécifiques dans notre modèle d'EA à Ac anti-NMDAR et surtout l'implication de nombreux acteurs cellulaires potentiellement régulés par différentes populations de lymphocytes Th. Pour comparer la cinétique de la production de cytokines avec notre modèle, il nous faudrait réaliser leur dosage à différents temps afin de déterminer si les résultats que nous avons obtenus, à 15 jours suivant l'immunisation, se situent au pic ou non de leur production.

Notre observation de lymphocytes T spécifiques va dans le sens de l'étude réalisée par Jones et collaborateurs, menée avec un autre modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR, qui a également montré l'implication des lymphocytes T dans la pathologie (Jones et al. 2019). En effet, des animaux déficients de la chaîne  $\alpha$  du TCR, ont été immunisés avec les protéines GluN1 et GluN2 mais n'ont pas développé la pathologie. De plus, il n'a pas été retrouvé de production d'Ac ciblant la sous-unité GluN1 du NMDAR. Cependant, une étude menée chez des patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR montre une diminution de la fréquence des lymphocytes T CD4 spécifiques par rapport aux témoins sains (Dao et al. 2021). Le test a été effectué en mesurant la fréquence des cellules produisant des cytokines pro-inflammatoires, le TNF- $\alpha$  et l'IFN- $\gamma$ , après restimulation *in vitro* par le NMDAR recombinant. Néanmoins, ces analyses ont été effectuées après traitements immunomodulateurs. Les patients avaient déjà reçu des immunothérapies de première et/ou de deuxième ligne, ce qui a pu avoir un impact sur les populations lymphocytaires étudiées. De plus, le stade d'avancée de la pathologie au moment du prélèvement n'est pas connu. Une variation des populations lymphocytaires au cours l'évolution de la maladie n'est pas à exclure. Concernant les analyses biologiques, seules deux cytokines ont été testées évoquant un profil

lymphocytaire Th1 mais les profils lymphocytaires Th17, Th2 et Th folliculaires n'ont pas été investigués. Il serait nécessaire d'approfondir ces résultats et cela au préalable à tout traitement.

Nous avons également étudié la réponse lymphocytaire T dirigée contre GluN1 au niveau des méninges, zones identifiées comme porte d'entrée dans le SNC ([Strominger et al. 2018](#)). L'infiltration des méninges par des lymphocytes T spécifiques est peu décrite dans les modèles de neuroinflammation. Ceci peut s'expliquer par la très faible quantité de cellules recueillies au niveau de ces organes rendant leurs analyses difficiles. Au niveau des méninges, nous avons mis en évidence des lymphocytes T CD4 spécifiques de GluN1 mais également des lymphocytes B activés. Ces résultats suggèrent une coopération T/B au niveau du SNC. Notre hypothèse serait que, les lymphocytes B activés auraient un rôle de CPA, comme dans le modèle EAE, et stimuleraient les lymphocytes T CD4 spécifiques. En retour, ces lymphocytes T CD4 activeraient les lymphocytes B ainsi que les plasmocytes pathogéniques ([Mitsdoerffer et al. 2010](#)). De manière différente, dans le modèle EAE, les lymphocytes T CD4 activeraient préférentiellement les cellules myéloïdes (microglie et macrophages) qui sont les effecteurs pathogéniques principaux (**Figure 43**).

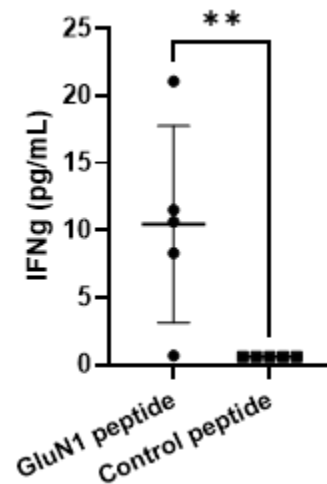


**Figure 43 : Hypothèses du rôle des lymphocytes B et T dans les modèles de l'EAE et de l'EA à Ac anti-NMDAR.**

Dans l'EAE, les lymphocytes T vont reconnaître l'Ag présenté par les lymphocytes B. L'activation des lymphocytes T conduit à l'activation des cellules myéloïdes et macrophages, participant à la destruction de la gaine de myéline. Dans l'EA, l'interaction entre les lymphocytes T et B va activer les lymphocytes B, se différenciant en plasmocytes produisant les Ac qui vont conduire à l'internalisation des NMDAR. EAE, encéphalomyélite autoimmune expérimentale ; AE, EA à Ac anti-NMDAR.

Le profil lymphocytaire Th dans les méninges, analysable par la sécrétion de cytokines après réactivation avec le peptide GluN1, n'a pas pu être clairement établi faute d'un nombre suffisant de cellules. Cependant, nous avons mis en évidence une faible production spécifique d'IFN- $\gamma$  indiquant au moins un profil lymphocytaire Th1 (**Figure 44**), les autres cytokines, TNF- $\alpha$ , MCP-1, IL-17, IL-4, IL-21 et IL-1 $\beta$  n'ont pas été

détectées. Afin de compléter la caractérisation du profil Th, il est envisagé l'utilisation d'autres techniques plus performantes (cf supra).



**Figure 44** : Production d'IFN- $\gamma$  par les cellules extraites des méninges des souris EA à Ac anti-NMDAR.

Les cellules des méninges, issues des souris immunisées avec le peptide GluN1, à J15 post-immunisation, ont été cultivées pendant 24h en présence du peptide GluN1. La production d'IFN- $\gamma$  a été mesurée dans le surnageant de culture par méthode ELISA (enzyme linked immuno sorbent assay). n=4 ; \*\*p<0,01.

Le phénotypage des cellules au sein des méninges a montré que parmi les leucocytes (CD45+), seule une faible population est représentée par les lymphocytes T et B. Il est vraisemblable que les cellules CD45+ CD3- CD19- soient des cellules myéloïdes, de type CPA telles que les cellules dendritiques (CD11c+/CD11b+) ou les macrophages (CD11c-/CD11b+). Une information intéressante pour la compréhension de notre modèle serait de connaître leur état d'activation mesurable, par exemple, par le niveau d'expression des molécules de CMH II et des molécules de co-stimulation CD80 et CD86. La recherche de polynucléaires neutrophiles (PNN) par le marqueur Ly6G pourrait également être pertinente. En effet, dans l'EAE, le recrutement des PNN permet l'accumulation des lymphocytes B dans les méninges (Parker Harp et al. 2019).

De plus, ces PNN ont la possibilité de se différencier en un sous type, les cellules suppressives dérivées des myéloïdes (MDSC) au niveau des méninges, *via* l'activation du facteur de transcription STAT3, permettant de contrôler l'accumulation et l'activation des lymphocytes B (Knier et al. 2018). L'absence de cette différenciation en MDSC pourrait donc permettre l'activation des lymphocytes B à ce niveau. Parmi les lymphocytes T CD3, comme dans la rate, il est observé une forte proportion de DN dans les méninges. Ces lymphocytes pourraient être des lymphocytes T non conventionnels porteurs d'un TCR $\gamma\delta$ . Ce type cellulaire a été mis en évidence dans les méninges de souris naïves, dès la naissance et perdurant tout au long de la vie (Ribeiro et al. 2019). Ribeiro et collaborateurs ont également montré que les lymphocytes T  $\gamma\delta$  présents à ce niveau sont responsables de la production d'IL-17 et que celle-ci est requise dans les processus de mémorisation à court terme, sans impacter la motricité ou l'anxiété des animaux. Une autre publication d'Alves de Lima et collaborateurs, a confirmé la sécrétion d'IL-17 dans les méninges par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  mais également une diminution de l'état d'anxiété chez les souris déficientes en IL-17 (Alves de Lima et al. 2020). Ce comportement n'est pas associé à un déficit de mémorisation ni de sociabilité chez les animaux. La sécrétion d'IL-17 par les lymphocytes T  $\gamma\delta$  dans les méninges serait donc nécessaire aux processus de mémorisation ainsi qu'au maintien d'un niveau de vigilance chez les souris. Ces données sont d'autant plus intéressantes dans notre modèle, où des troubles de la mémorisation et un comportement anxieux ont été mis en évidence (Wagnon et al. 2020). L'identification d'éventuels lymphocytes T  $\gamma\delta$  produisant de l'IL-17, mais aussi des lymphocytes Th17 est donc d'un intérêt majeur pour la caractérisation des mécanismes mis en jeu dans l'EA à Ac anti-NMDAR.

Au cours de nos travaux, nous avons mis en évidence des lymphocytes T CD8 spécifiques dans notre modèle. Les lymphocytes T CD8 spécifiques de la myéline (peptides MOG et MBP) ont déjà été montrés comme étant impliqués dans l'EAE (Sun et al. 2001; Bettini, Rosenthal, et Evavold 2009). En effet, lorsque ces lymphocytes activés sont injectés *via* un transfert passif, ceux-ci sont capables d'induire la pathologie. Il serait nécessaire d'approfondir leur rôle dans l'EA à Ac anti-NMDAR, et notamment leur rôle le plus connu, la cytotoxicité. Des tests de cytotoxicité *in vitro* sur des cellules exprimant le NMDAR mises en présence de lymphocytes T CD8 activés, issus d'animaux immunisés, pourraient permettre d'apporter un élément de réponse. Le rôle de ces lymphocytes pourrait également passer par la production de cytokines pro-inflammatoires et l'induction de ROS (espèces réactives de l'oxygène), participant ainsi à l'inflammation, comme cela a été montré dans l'EAE (Wagner et al. 2019). A l'instar des lymphocytes T CD4, leur profil de sécrétion de cytokines permettrait leur caractérisation fonctionnelle plus fine.

Nos travaux montrent la présence de lymphocytes T CD4 spécifiques dans la rate et les méninges, possédant un profil polyfonctionnel. Nous avons entrepris des expériences complémentaires pour caractériser les sous populations lymphocytaires T et B dans les plexus choroïdes, un autre organe important pour l'immunité et l'inflammation dans le SNC (Strominger et al. 2018). Cependant, notre étude en cytométrie en flux n'a pas abouti faute d'un nombre suffisant de cellules. Afin de réaliser cette analyse, il serait nécessaire de « pooler » de nombreux animaux pour obtenir un nombre de cellules suffisant. Pour illustration, dans les animaux immunisés avec le peptide GluN1, nous avons obtenus lors de l'analyse en cytométrie en flux environ 70% de leucocytes pour les méninges contre 5% pour les plexus choroïdes. Nous estimons qu'entre 5 et 10 animaux seraient nécessaires pour obtenir le même

nombre de leucocytes dans les plexus choroïdes, ce qui est inenvisageable et nous oblige à nous tourner vers une technique plus sensible nécessitant moins de matériel biologique (cf supra).

Une étude a été initiée au laboratoire pour caractériser les lymphocytes T CD4 spécifiques de GluN1 de manière très précise au niveau de la rate. Les splénocytes des souris EA à Ac anti-NMDAR à J15 post-immunisation ont été réactivés par le peptide GluN1 *in vitro* pendant 48h et les cellules CD4+CD69+ ou CD4+CD69- ont été triées par FACS. Nous avons tenté de réaliser une étude protéomique de ces deux types cellulaires mais celle-ci a échoué pour des raisons techniques. Des analyses protéomiques sont néanmoins en cours sur les cellules totales issues des méninges et des plexus choroïdes d'animaux immunisés avec le peptide GluN1 vs les animaux « sham ».

Par ailleurs, le rôle des lymphocytes T spécifiques dans la pathologie pourra être plus précisément caractérisé par l'utilisation d'un modèle de transfert passif. Les modèles d'immunisation passive sont bien connus dans l'EAE et ont permis de montrer le rôle pathogénique des lymphocytes T CD4 (Cross et Raine 1990). Ainsi, dans le cas de l'EA à Ac anti-NMDAR, un modèle possible consisterait à injecter, par voie i.v., des lymphocytes T CD4 spécifiques issus d'animaux immunisés avec le peptide GluN1, à des souris déficientes en lymphocytes T CD4 et immunisées avec ce même peptide. Un autre modèle consisterait à injecter à la fois des lymphocytes T CD4 spécifiques et des Ac anti-NMDAR, cette fois-ci à une souris naïve. Cependant, dans ce cas, le passage de la BHE reste essentiel, ce qui nécessiterait possiblement l'utilisation de toxine pertussique ou d'un modèle facilitant son ouverture tel que le modèle ApoE. Cette dernière stratégie d'utilisation de modèle de transfert passif a été utilisée dans

le modèle de la neuromyéélite optique (NMO) pour mettre en évidence un effet délétère des lymphocytaires T CD4 (Duan et Verkman 2020). La NMO se caractérise par une névrite optique avec une perte visuelle, associée à une faiblesse progressive des membres et des contractures musculaires (Hardy et al. 2016). Cette pathologie est caractérisée par la production d'auto-Ac encéphalitogéniques, dirigés contre l'aquaporine-4.

Enfin, nous pourrions utiliser d'autres technologies permettant une étude globale et la plus précise possible à l'heure actuelle des lymphocytes T impliqués dans notre modèle d'EA à Ac anti-NMDAR. La première étape consisterait à trier des lymphocytes T spécifiques de GluN1, au sein de la rate et des méninges, *via* l'utilisation de tétramères. S'en suivrait une analyse par « single cell RNA sequencing », sur l'ensemble des sous populations de lymphocytes T spécifiques (Th, T CD8, T régulateurs, T  $\gamma\delta$ ). Cette technique a l'avantage de nécessiter qu'un nombre limité de cellules. Cette caractérisation est à poursuivre dans une analyse cinétique et dans différentes localisations anatomiques : la rate, les ganglions cervicaux, les méninges et les plexus choroïdes. Dans l'EAE, l'utilisation de cette technique a permis de mettre en évidence une réponse des lymphocytes Th17 différente en fonction de leur localisation, que ce soit dans le SNC ou dans les organes périphériques (Gaublomme et al. 2015).



## 2. Induction d'une immunothérapie tolérogène dans le modèle EA à Ac anti-NMDAR

La stratégie d'immunothérapie que nous développons dans notre modèle d'EA à Ac anti-NMDAR a pour objectif d'induire un état de tolérance vis-à-vis de GluN1 en absence de toxicité. Notre choix s'est porté sur les NP à base de PLGA pour leurs caractéristiques de biodégradabilité, les rendant utilisables chez l'homme. D'autre part, les NP PLGA se sont révélées efficaces dans la prévention de nombreuses pathologies autoimmunes et/ou inflammatoires dans des modèles animaux tels que l'EAE, le DT1, l'allergie respiratoire ou encore la maladie coéliquaie (Hunter et al. 2014; Prasad et al. 2018; Smarr et al. 2016; Freitag et al. 2020). La formulation des NP PLGA contenant le peptide GluN1 encapsulé, a été réalisé grâce à une collaboration avec le Pr Aurélie Malzert-Fréon et le Dr Anne-Claire Groo du centre d'étude et de recherche sur le médicament de Normandie (CERMN, Caen). Une partie du travail a consisté à mettre au point le procédé de formulation des NP PLGA en vue de leur utilisation en immunothérapie tolérogène. Des NP PLGA dites blanches (sans peptide encapsulé) ont donc été synthétisées. Nos NP PLGA blanches ont une taille de l'ordre de 410 nm et possèdent une charge de surface d'environ -65 mV (**Tableau 1**). Ces caractéristiques vont dans le sens des NP PLGA blanches formulées par Hunter et collaborateurs, qui sont de l'ordre de 430 nm avec une charge de surface de l'ordre de -67 mV (Hunter et al. 2014).

Taille (nm, Z-average)	Potentiel zeta (mV)
409.3 +/- 8.84	-65.38 +/- 2.06

**Tableau 1** : Caractéristiques des NP PLGA blanches formulées.

Les NP sont formulées par un processus de double émulsion. Leur taille est mesurée en nm et la charge de surface est évaluée par le potentiel zeta en mV.

Des tests d'injection de ces NP PLGA blanches à des animaux naïfs n'ont pas montré de toxicité apparente avec une absence à la fois de modification du comportement des animaux et de défaut de croissance pondérale.

Ces résultats nous ont conduits à la formulation des NP PLGA avec le peptide GluN1. Les dosages par CBQCA (3-(4-carboxybenzoyl)-2-quinoline-carboxaldehyde), méthode de dosage fluorimétrique, après digestion des NP PLGA dans du DMSO afin de libérer le peptide, n'ont pas permis de mettre en évidence l'encapsulation du peptide GluN1 ou du peptide contrôle ovalbumine. Le manque de temps par rapport au déroulé de la thèse ne nous a pas permis d'optimiser la phase de synthèse des NP PLGA avec les peptides et nous a conduit à interagir directement avec l'équipe du Pr Miller de l'université de Northwestern de Chicago, Etats-Unis, pour la synthèse des NP PLGA encapsulant les peptides.

Dans nos expériences, la stratégie d'immunothérapie par injection i.v. des NP PLGA GluN1 7 jours en amont de l'immunisation, s'est avérée efficace au niveau biologique : nous avons observé une diminution du niveau d'expression des marqueurs d'activation des lymphocytes T CD4 et T CD8. Ceci indique un effet tolérogène des NP contenant le peptide GluN1 encapsulé, sur la réponse à l'immunisation avec ce même peptide. Ces résultats seront à conforter avec le dosage des cytokines après réactivation avec le peptide GluN1, comme vu dans la partie précédente. De manière importante, il nous reste prochainement à évaluer l'effet du traitement par NP PLGA sur la production d'Ac anti-NMDAR dans le sérum des souris immunisées avec le peptide GluN1. Nous nous attendons à observer une diminution des Ac spécifiques comme ce qui a été observé dans le modèle de maladie cœliaque utilisant des NP PLGA encapsulant la protéine de la gliadine (Freitag et al. 2020).

Dans le modèle EAE, l'effet des NP suite à leur administration par voies i.p., s.c. et orale a été évalué (Hunter et al. 2014). Les résultats montrent que les voies d'administration s.c. et orale ne sont pas efficaces et n'entraînent aucune prévention de la pathologie. La voie i.p. induit une légère diminution de la pathologie mais est nettement moins efficace que la voie i.v. L'efficacité de cette voie est probablement liée au ciblage dans le foie des NP suite à leur administration. Au sein de cet organe, les cellules de Kupffer et les cellules endothéliales sinusoidales du foie joueraient un rôle indispensable à l'induction de la tolérance et à la génération de lymphocytes T régulateurs (Casey et al. 2022; Carambia et al. 2015). Cette voie i.v. est une voie d'administration considérée comme invasive. Il serait pertinent d'étudier d'autres voies d'administration moins invasives et plus confortables pour les patients. Par exemple, la voie intra-nasale fait partie des voies d'administration à l'étude pour la délivrance de molécules dans le SNC (Gonzalez-Burgos et Lewis 2012; Musumeci et al. 2022). Un avantage conféré par cette voie est sa proximité anatomique avec le SNC et notamment son accès *via* la plaque cribiforme et les vaisseaux lymphatiques nasaux, permettant de s'affranchir du passage de la BHE (Engelhardt, Vajkoczy, et Weller 2017). Cette voie serait donc intéressante à comparer à la voie i.v.

Des études complémentaires sur la répartition des lymphocytes T CD4 spécifiques, au sein de la rate et des méninges, par utilisation de tétramères par exemple, seront à réaliser. Des variations dans les populations lymphocytaires, et particulièrement des lymphocytes T régulateurs, seront à rechercher.

D'autre part, la dose de NP PLGA a été déterminée en fonction de ce qui a déjà été effectué dans le modèle EAE (Hunter et al. 2014) et suivant les recommandations de l'équipe du Pr Miller. Une étude dose-réponse complète dans notre modèle reste à mener.

Cependant, les résultats biologiques obtenus ne se sont pas retranscrits dans les tests comportementaux. L'effet des NP PLGA n'a pas été mis en évidence sur le test du Y-maze et du O-maze, tests montrant une altération de la mémoire et une anxiété chez les souris EA à Ac anti-NMDAR (Wagnon et al. 2020). D'autre part, un suivi sur 24h des animaux, permettant l'enregistrement de leurs phases d'activité et de repos, a été effectué et est en cours d'analyse. A ce jour, une explication possible à cette discordance est que les animaux peuvent être sensibles à des variations de conditions extérieures tels qu'un effet expérimentateur ou encore des modifications dans les conditions d'hébergement des animaux. Ces analyses sont à reproduire et bien que le modèle ait été validé avec le test du Y-maze et O-maze, d'autres tests pourraient être utilisés pour permettre de poursuivre la caractérisation de notre modèle, tels que le test de la nage forcée, la suspension par la queue ou encore le three-chamber test et l'open-field, ces derniers étant déjà utilisés dans d'autres modèles d'EA à Ac anti-NMDAR (Ding et al. 2021; Jones et al. 2019). Enfin, il est possible qu'une immunisation avec le peptide GluN1 ne soit pas totalement suffisante pour induire des modifications du comportement systématiquement caractérisables. Dans ce cas, un « reboost » d'immunisation pourrait être envisagé comme c'est déjà le cas dans les modèles de Ding et collaborateurs ainsi que Jones et collaborateurs.

Pour résumer, l'utilisation de NP PLGA, contenant le peptide GluN1 encapsulé, a montré un effet biologique préventif sur notre modèle d'EA à Ac anti-NMDAR. La validation de cette étape est importante puisque l'intérêt d'une stratégie tolérogénique se situerait dans le traitement préventif d'éventuelles rechutes chez les patients atteints d'EA à Ac anti-NMDAR, s'élevant à environ 12% (Titulaer et al. 2013). Dans le modèle EAE récurrente-rémittente, les NP PLGA ont montré leur efficacité dans la prévention des rechutes (Hunter et al. 2014). Cependant, un modèle d'EA à Ac anti-

NMDAR présentant des rechutes n'a pas été décrit à l'heure actuelle et serait donc à développer *via* par exemple, la réalisation de « reboost » d'immunisation. L'efficacité des NP PLGA pouvant être testée avant chaque « reboost ».

D'autres types de NP, tels que les liposomes ont également montré leur efficacité dans la prévention de l'EAE en induisant la diminution de cytokines pro-inflammatoires et l'augmentation de cytokine anti-inflammatoire (Kenison *et al.* 2020). Dans divers modèles animaux dont l'EAE et souris humanisées, l'utilisation de NP d'oxyde de fer conjuguées à des molécules du CMH II liant l'Ag, induit la production de cellules T CD4 régulatrices permettant la rémission de la pathologie (Clemente-Casares *et al.* 2016). Toujours dans un modèle EAE, une approche utilisant des ARNm modifiés encapsulés dans des liposomes, a permis de générer des lymphocytes T régulateurs qui exercent une suppression des lymphocytes T effecteurs mais également une immunosuppression par effet « bystander » (Krienke *et al.* 2021).

Les études, menées chez l'animal, de l'utilisation des NP dans l'induction d'une immunothérapie tolérogène sont prometteuses et offrent de nouvelles perspectives de traitements chez l'homme.

## V. CONCLUSION



## Conclusion

Pour conclure ce travail de thèse, nous avons identifié et caractérisé des lymphocytes T spécifique de GluN1 au niveau de la rate et du SNC dans notre modèle. Cette observation est un point de départ pour ultérieurement mieux comprendre le rôle des lymphocytes T dans la physiopathologie de l'EA à Ac anti-NMDAR.

Nous avons également montré l'efficacité de l'utilisation de NP PLGA GluN1 sur la prévention de l'activation des lymphocytes T dans notre modèle. Bien que ces travaux offrent de nouvelles perspectives pour le développement de stratégies thérapeutiques tolérogéniques, il reste néanmoins à optimiser l'étude comportementale dans notre modèle d'EA à Ac anti-NMDAR.





## AUTRES TRAVAUX

**Article 1 : Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against N-methyl-D-aspartate receptor, *Brain* 2020.**

Ce premier article auquel j'ai collaboré correspond à l'étude de la mise en place du modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR au sein de notre laboratoire. Au cours de ces travaux, j'ai participé à la réalisation d'expériences complémentaires demandées par les « reviewers ». Ces expériences consistaient à isoler les cerveaux d'animaux préalablement immunisés avec le peptide GluN1 puis en leur marquage pour analyse des populations de lymphocytes T en cytométrie en flux. Ces données n'ont pas mis en évidence de différence significative dans les proportions de lymphocytes T CD4 et CD8 dans les cerveaux de souris immunisées avec le peptide GluN1 vs leur contrôle sham.

**Article 2 : Tissue plasminogen activator worsens experimental autoimmune encephalomyelitis by complementary actions on lymphoid and myeloid cell responses, *Journal of Neuroinflammation* 2021.**


Ce second article met en évidence l'impact de l'activateur tissulaire du plasminogène (tPA) dans le modèle EAE. Pour cet article, j'ai réalisé et analysé l'ensemble des immunohistochimie présentées. Il s'agit de l'étude de l'infiltration des lymphocytes T dans la moelle épinière d'animaux déficients en tPA comparé à leur contrôle « wild-type ». Ces travaux ont montré une diminution de l'infiltration des lymphocytes T chez les animaux déficients en tPA. J'ai également participé aux révisions de l'article en réalisant des cultures cellulaires de splénocytes incubés ou non avec du tPA afin d'étudier l'effet de ce dernier sur l'activation des lymphocytes T.

**Article 3 : Tissue-plasminogen activator alters the phenotype of splenic mononuclear phagocyte cells in acute inflammation, *in preparation*.**

Ce troisième article met en évidence les effets du tPA sur les acteurs de l'immunité innées tels que les cellules dendritiques et les macrophages. Pour ces travaux ma contribution a essentiellement porté sur les techniques d'extraction et d'isolement des lymphocytes T issus des organes lymphoïdes secondaires ainsi que sur les expériences de cytométrie en flux.



# Autoimmune encephalitis mediated by B-cell response against *N*-methyl-D-aspartate receptor

Isabelle Wagnon,<sup>1</sup> Pauline He´lie,<sup>1</sup> Isabelle Bardou,<sup>1</sup> Caroline Regnaud,<sup>1</sup> Le´onie Lesec,<sup>1</sup> Jeroˆme Leprince,<sup>2</sup> Mikae¨l Naveau,<sup>3</sup> Barbara Delaunay,<sup>1</sup> Olivier Toutirais,<sup>1,4</sup> Brigitte Lemauff,<sup>1,4</sup> Olivier Etard,<sup>5,6</sup> Denis Vivien,<sup>1,7</sup> Ve´ronique Agin,<sup>1</sup> Richard Macrez,<sup>1,8</sup> Eric Maubert<sup>1</sup> and  Fabian Docagne<sup>1</sup>

Anti-*N*-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a neuropsychiatric disease characterized by an antibody-mediated autoimmune response against NMDAR. Recent studies have shown that anti-NMDAR antibodies are involved in the pathophysiology of the disease. However, the upstream immune and inflammatory processes responsible for this pathogenic response are still poorly understood. Here, we immunized mice against the region of NMDA receptor containing the N368/G369 amino acids, previously implicated in a pathogenic response. This paradigm induced encephalopathy characterized by blood–brain barrier opening, periventricular T<sub>2</sub>-MRI hyperintensities and IgG deposits into the brain parenchyma. Two weeks after immunization, mice developed clinical symptoms reminiscent of encephalitis: anxiety- and depressive-like behaviours, spatial memory impairment (without motor disorders) and increased sensitivity to seizures. This response occurred independently of overt T-cell recruitment. However, it was associated with B220<sup>+</sup> (B cell) infiltration towards the ventricles, where they differentiated into CD138<sup>+</sup> cells (plasmocytes). Interestingly, these B cells originated from peripheral lymphoid organs (spleen and cervical lymphoid nodes). Finally, blocking the B-cell response using a depleting cocktail of antibodies reduced the severity of symptoms in encephalitis mice. This study demonstrates that the B-cell response can lead to an autoimmune reaction against NMDAR that drives encephalitis-like behavioural impairments. It also provides a relevant platform for dissecting encephalitogenic mechanisms in an animal model, and enables the testing of therapeutic strategies targeting the immune system in anti-NMDAR encephalitis.

- 1 Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, U1237, PhIND “Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders”, Institut Blood and Brain at Caen-Normandie, Cyceron, Caen, France
- 2 Normandie Univ, UNIROUEN, INSERM, U1239, Neuronal and Neuroendocrine Differentiation and Communication, Rouen, France
- 3 Normandie Univ, UNICAEN, CNRS UMS 3408, Cyceron, Caen, France
- 4 Department of Immunology, Caen University Hospital, CHU Caen, Caen, France
- 5 Normandie Univ, UNICAEN, ISTS, EA 7466, Cyceron, Caen, France
- 6 Service des explorations fonctionnelles du syste`me nerveux, CHU de Caen, Caen, France
- 7 Department of Clinical Research, Caen University Hospital, CHU Caen, Caen, France
- 8 Emergency Department, Caen University Hospital, CHU Caen, Caen, France

Correspondence to: Fabian Docagne, PhD  
 Inserm U1237, PhIND, Institut BB@C, Centre Cyceron, BP5229, 14074 Caen Cedex, France  
 Email: [docagne@cyceron.fr](mailto:docagne@cyceron.fr)

**Keywords:** autoimmune encephalitis; glutamate; neuropsychiatry; paraneoplastic; limbic

**Abbreviation:** NMDAR = *N*-methyl-D-aspartate receptor

## Introduction

Anti-N-methyl-D-aspartate receptor (NMDAR) encephalitis is a neuropsychiatric disorder first characterized by Josep Dalmau's group (Dalmau *et al.*, 2008). Tumours (mostly ovarian teratomas) (Dalmau *et al.*, 2008) and herpes simplex encephalitis (Nosadini *et al.*, 2017) are the two main triggers of the disease. It affects 1.5 per million individuals every year. Its presentation is variable among patients and includes psychiatric disturbances (hallucination, confusion, and psychosis), cognitive impairments (deficits in executive functions and memory (Finke *et al.*, 2012), epileptic seizures (Dalmau *et al.*, 2008; Vincent and Bien, 2008; Irani *et al.*, 2010; Geis *et al.*, 2019) or sleep disturbance (DeSena *et al.*, 2014). The associated encephalopathy can lead to movement disorder, autonomic dysfunction, hypoventilation and, in some cases, coma (Dalmau *et al.*, 2008; Irani *et al.*, 2010).

This disease is closely associated with the presence of autoreactive antibodies against NMDAR in the CSF and serum of patients (Gresa-Arribas *et al.*, 2014; Hara *et al.*, 2018), although they may not be the only antibodies to be causative. The autoimmune nature of this disease is supported by the detection of inflammatory infiltrates, including B cells and CD138<sup>+</sup> antibody-secreting cells (CD138<sup>+</sup>), in perivascular, interstitial, and Virchow-Robin spaces of post-mortem patient brains (Martinez-Hernandez *et al.*, 2011). These infiltrates are considered responsible for the intrathecal production of autoreactive antibodies.

Further studies have shown that these antibodies disrupt the interaction of NMDAR with partner transmembrane proteins, such as Ephrin B2 receptors, which govern their presence at the synapse (Mikasova *et al.*, 2012). When this interaction is lost, NMDAR are internalized and their synaptic density drops. This leads to perturbation of synaptic transmission and surface dynamics of NMDAR (Je'ze'quel *et al.*, 2017) and may explain the observed symptoms. To promote these effects, the autoreactive anti-NMDAR antibodies recognize a portion of the amino-terminal domain of NMDAR that comprises the critical amino acids asparagine and glycine at position 368/369 of the protein (Gleichman *et al.*, 2012).

This crucial role of NMDAR antibodies in the pathogenesis of the disease was recently highlighted in an animal model where pooled CSFs from anti-NMDAR encephalitis patients were injected directly into the CSF of mice (Planaguma *et al.*, 2015). Behavioural deficits were observed, reminiscent of the human disease: spatial memory deficits, anhedonia and depressive-like behaviour. An increased sensitivity to pharmacologically-induced seizures, relevant to the epileptic phenotype of the human disease, was also reported (Wright *et al.*, 2015). Given the nature of this experimental paradigm, the autoimmune processes responsible for the production of autoreactive anti-NMDAR antibodies were not addressed in these previous studies.

In the present study, we induced in mice an active immunization against the portion of NMDAR involved in the

human pathology. This led to the production of autoreactive anti-NMDAR antibodies in the circulation and the CSF. We report a pathological frame providing an immune-mediated model of anti-NMDAR encephalitis in which behavioural and cognitive impairments arose in combination with encephalopathy. Importantly, these pathological events occurred in a context of autoimmune, B-cell-mediated response triggering the CNS.

## Materials and methods

### Animals

Eight-week-old male C57BL/6J (25–30 g) (Janvier labs) were housed in our central animal house (CURB: centre universitaire de ressources biologiques, Caen University) at a controlled temperature ( $21 \pm 1^\circ\text{C}$ ) and humidity ( $55 \pm 10\%$ ) in 12-h inverted light cycle (light period: 7 pm to 7 am) with food and water *ad libitum*. Animals were weighed daily during the protocols. Health status was controlled and provided by the CURB. All experiments were performed during the dark phase. Animals were habituated to the experimental room for 30 min before each experiment. All procedures were performed according to official guidelines under approval of institutional ethics committee (Comite' Normand d'ethique en matie're d'expe'rimmentation animale, CeNomExA. Project licence number #11904) in accordance with the European directive N° 2010/63/UE. The experiments were performed and reported in accordance to the ARRIVE guideline.

### Experimental group allocation

Animals were randomly allocated to experimental group: each cage was given a letter by an individual not associated with the experiments. The experimenter was blinded to experimental groups until the end of the protocol. For ethical considerations, each cage contained animals from the same group in order to avoid mixing potentially sick animals with animals in which the disease is milder or absent and exposing them to harmful conditions (fights, competition for dominance, access to food etc. with animals in a better health condition). The order in which the animals in the different experimental groups were treated and assessed was also determined in a random way at the beginning of the protocol. Correspondence between letters and experimental groups was revealed to the experimenter after all analyses were performed.

### Statistical analyses

Results are presented as the mean  $\pm$  standard deviation (SD). Sample size are indicated in the text for each group and protocol. Normality test were performed on all sample with a Shapiro-Wilk test. If normality was assumed, we used Student's *t*-test. When normality could not be assumed, we used a non-parametric test (Wilcoxon for paired sample compared; Mann-Whitney U-test to compare two independent samples). All analyses were performed with Statistica PRO<sup>v</sup> software



version 13.3 and StatView<sup>®</sup>. *P*-values are given in the text (results) for each individual experiment.

## Peptide design

Previous reports (Gleichman *et al.*, 2012) have determined that the N368 and G369 amino acids on GluN1 are crucial for binding and subsequent effects of encephalitis antibodies on NMDAR. Our approach was to design a peptide that would recognize this region. To assess the theoretical immunogenicity of peptides included in GluN1, we used the BepiPred linear epitope prediction method (Immune Epitope Data Base and Analysis Resource, [www.iedb.org](http://www.iedb.org)). This algorithm predicts the immunogenicity of peptide based on the properties of its amino acids: presence/absence of an aromatic cycle, amino acid weight, chemical properties (acidic or basic), and length of the peptide. A score was given to each peptide from 0 (lowest immunogenicity) to 1 (highest immunogenicity). A negative score indicates theoretical non-immunogenicity.

## Active immunization

Autoimmune response was induced on 8-week-old male C57BL/6J mice (Janvier lab) via subcutaneous injection of 200 µg of selected peptide (GluN1<sub>359-378</sub> peptide or GluN1<sub>168-187</sub> control peptide) in an emulsion mixture (volume ratio 1:1) of complete Freund's adjuvant (Sigma Aldrich Laboratories) containing 600 µg of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco). For sham animals, the immunogenic peptide was replaced with 200 µl of saline. The emulsion was administered in four injections of 50 µl: two at shoulders and two at limbs. All animals were intraperitoneally injected with 200 µg of *Bordetella pertussis* toxin (Sigma Aldrich) in 200 µl of saline at the time of immunization, and at 48 h after immunization.

## Experimental design

After immunization with the GluN1<sub>359-378</sub> or the GluN1<sub>168-187</sub> control peptide, mice were subjected to one different behavioural test every day in the following order: actimetry, Y-maze, O-Maze, swimming test, starting 1 or 2 weeks after immunization, depending on the experiment. Tissue and fluids were collected on the last day of the series of behavioural tests.

## Detection of anti-NMDAR antibodies

Presence of NMDAR antibodies in serum was determined at the end of the first or second week post-immunization (as indicated in corresponding figure legends) by using HEK293 cell-based assay expressing GluN1a and GluN2b subunits. HEK293 were transfected with a mixture of pcDNA3-GluN1a and pcDNA3-GluN2b plasmids (2 µg of each) using the lipofection method (Lipofectamine<sup>®</sup>, Life Technologies). Cells were fixed with 4% paraformaldehyde (20 min, room temperature), permeabilized with PBS 0.1M-0.3% Triton<sup>™</sup> X-100 (Sigma Aldrich) and blocked with bovine serum albumin 4% (Sigma Aldrich) (1 h, room temperature). HEK293 were incubated with sera extracted from immunized mice at different dilutions (1:10; 1:40; 1:100; 1:1000; 1:2000; 1:3000) (overnight, 4°C). Rabbit anti-GluN1 antibody (ab9058; 1:800; Abcam) was used as positive

transfection control. The next day, cells were washed and incubated with F(ab)<sup>0</sup>2 fragments of donkey anti-mouse IgG (H + L), or anti-rabbit (1:800; Jackson ImmunoResearch) (1 h 30 min, room temperature).

## Behavioural tasks

All behavioural tests were assessed by researcher blinded to experimental condition using standardized tests. Behavioural tests were aimed to assess spatial memory (Y-maze), anxiety-like behaviour (O-maze), depressive-like behaviour (swim forced test) and spontaneous locomotor activity (horizontal and vertical assessment).

### O-maze

Anxious-like phenotype of mice was assessed by the elevated zero-maze (O-maze) (Cryan and Holmes, 2005). Behaviour in the O-maze reflects a conflict ('approach-avoidance') between the rodent's preference for protected areas and their innate motivation to explore novel environments. The apparatus (BMP Chaudronnerie) was a black circular PVC corridor (61 cm in diameter, 10 cm path width, 70 cm above floor level), which was equally divided into two opposite open quadrants and two opposite enclosed ones (15-cm high side walls). Each mouse was placed in the centre of a randomly chosen closed quadrant, and was then allowed to explore freely the maze during a 5-min period. Anxiety-like behaviour was assessed by the quantification of the time spent in the open quadrants.

### Y-maze

To assess cognitive functions, we used a two-trial place recognition task previously developed to study spatial cognition processes in rats and mice (Kraeuter *et al.*, 2019). The standard Y-maze used in this study consisted of white plastic with three identical arms (BMP Chaudronnerie). Extra-maze distal cues were suspended on the black curtains of the room walls at 123 cm from the maze (from the top of the cues to the centre of the maze). The behavioural procedure consisted in two trials separated by a 2.5-h intertrial interval. During the acquisition phase (trial 1), one randomly-chosen arm of the Y-maze was closed with a guillotine door. Each mouse was then placed in the start arm (arm 1), the head facing away from the centre of the maze, and allowed to freely visit the accessible parts of the maze (arm 1/arm 2) for 5 min. At the end of the trial, the labelled mouse was then replaced in its home cage. To exclude possible anxiety-related states towards the apparatus, we verified that the total number of visits in arms 1 and 2 of the Y-maze was similar between GluN1 immunized mice and sham mice, and that both groups visited arm 1 as often as arm 2. During the test phase (trial 2), animals had free access to all three arms (arm 1/arm 2/new arm) for 1 min. Spatial performance was assessed through the comparison of the number of visits made in each arm.

### Forced swim test

The forced swim test was used to assess depressive-like behaviour (Slattery and Cryan, 2012). Mice were individually placed into a glass cylinder containing warm water (25°C), deep enough to force the mouse to swim. The total trial time was 6 min and immobilization time measurement began from the second minute. Immobilization time was defined as the time that



animal stop swimming and start floating with its head above the water. This test is considered to reflect behavioural despair.

### Actimetry

Spontaneous locomotor activity was quantified by using a rack of eight activity cages equipped with horizontal infrared beams located across the long axis of the cage (Imetronic<sup>®</sup>). Mice were placed in individual acrylic chambers (30 × 20 × 20 cm) for 30 min. The number of horizontal movements was determined by breaks in movement-sensitive photo-beams that were then converted into locomotor activity counts. This test evaluates the hypo- or hyperactivity.

### Pharmacologically-induced seizures

These experiments were performed following a previously described method (Wright *et al.*, 2015). Briefly, a subthreshold injection (40 mg/kg) of pentylenetetrazol (PTZ) (Sigma Aldrich) diluted in 200 ml of saline was intraperitoneally injected in mice 2 weeks after immunization. After injection, mice were individually placed in their experimental cage and recorded for 60 min with a camera. The PTZ's scale (Lüttjohann *et al.*, 2009) was used to assess seizure stage (see PTZ scale in the [Supplementary material](#)). Investigator was blinded to experimental groups. Animals were terminated at the end of the experiment for ethical considerations.

### MRI

Microparticles of iron oxide (MPIOs) coupled to anti-P-Selectin antibodies were prepared as previously described (Fournier *et al.*, 2017). For MPIO imaging, we used 3D respiration-gated T<sub>2</sub>\*-weighted gradient with echo imaging with flow compensation (GEFC; spatial resolution of 150 mm × 75 mm × 75 mm interpolated to an isotropic resolution of 75 mm with echo time/repetition time: 8.6/200 ms and a flip angle of 25° (acquisition time = 10 min). Settings for 2D-T<sub>2</sub>-high-resolution-weighted multi spin multi echo (MSME) imaging were: echo time/repetition time, 62.57/2351.68; flip angle 90°; acquisition time 7 min 31 s, slice thickness: 0.5; slice separation: 0.5. Settings for 2D- T<sub>2</sub>-high resolution FLAIR imaging were: echo time/repetition time: 62.57/4000; flip angle, 90°; acquisition time: 38.24 min; slice thickness, 4.5 mm; slice separation, 4.5.

### In vivo vascular permeability

Mice received an intravenous injection of 200 ml of 2% Evan's blue solution in saline and were left awake in their cage for 4 h. Brains were extracted after perfusion and placed in optical imaging (Biospace<sup>™</sup>), and Evan's blue fluorescence was measured (excitation 650 nm and emission filter 700 nm). Fluorescence was quantified with M3 Vision software (Biospace).

### CSF protein dosage

Total protein concentration was measured in CSF samples (2 ml) by measuring their absorbance at 280 nm on a Nanodrop<sup>™</sup> spectrophotometer (Thermo Scientific).

### Tissue processing

Mice were deeply anaesthetized and perfused with cold heparinized saline until total blood removal. For histology, mice were then perfused with a 150 ml solution of 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid. Next, brain, spleen and cervical lymph node were extracted and cryoprotected in four successive 20% sucrose baths for 24 h at 4°C. Organs were included in Tissue-Tek (Miles scientific) and conserved at -80°C. Cryomicrotome-cut axial slice (8–10 mm) were collected on poly-lysine slides (Thermo scientific) and stored at -80°C before processing.

### Immunostaining

Sections were co-incubated overnight at room temperature with the following antibodies: Rabbit anti-laminin or chicken anti-laminin (1:1500; Abcam), rat anti-CD4 (1:25; eBiosciences), rat anti-CD8 (1:25; eBiosciences), sheep anti-fibrinogen serum, rat anti CD45R/B220 (RA3-6B2) (1:800; Invitrogen), rabbit anti-syndecan-1 (1:800; Abcam) or sheep anti-TTR (ab9015) (Abcam; 1:1000). Primary antibodies were revealed by using AffiniPure F(ab<sup>0</sup>)<sub>2</sub> fragment IgGs conjugated to Alexa<sup>488</sup>, Cy3 or Alexa<sup>647</sup> at 1:800 (Jackson ImmunoResearch). Next, sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI. Assessment of neurodegeneration was performed by Fluoro-Jade<sup>®</sup> C staining (Schmued *et al.*, 2005).

### Microscopy

Images were digitally captured on a Leica DM6000 microscope coupled to Coolsnap camera, visualized with Metavue software (Version 5.0; Molecular Devices), and further processed by using ImageJ software (Version 1.49e; NIH). All analyses were performed blinded to the experimental groups.

### Dot blot

A recombinant peptide corresponding to the N-Terminal part of GluN1 was blotted on a nitrocellulose membrane for 1 h at room temperature until the blots were dry. The membrane was then blocked with 2% bovine serum albumin in TTBS (50 mM Tris, 0.5 M NaCl, 0.05% Tween-20, pH 7.4) for 1 h at room temperature. The membrane was then incubated for 1 h at room temperature in TTBS with CSF from sham or GluN1<sup>359-378</sup> mice, or with Glunomab<sup>®</sup> (Lesept *et al.*, 2016) an anti-GluN1 antibody as a positive control. The membrane was washed three times (10 min each) in TTBS on rocker before incubation with anti-mouse IgG secondary antibody for 1 h at room temperature in TTBS. Membrane was washed again three times (10 min each) in TTBS on rocker. Blots were enhanced for analysis and detection by chemiluminescence agent Thermo Scientific Pierce ECL Plus substrate and data were obtained by ImageQuant LAS 4000 (GE Healthcare Life Sciences).

### Calcium video microscopy

Neuron cultures were prepared from embryonic Day 14.5 Swiss mice as previously described (Nicole *et al.*, 2001). Cortices were dissected and dissociated in Dulbecco's modified Eagle medium (DMEM), and cultured in DMEM supplemented with 5% foetal bovine serum, 5% horse serum and 2 mM glutamine on 35 mm dishes with poly-lysine (0.1 mg/ml)/laminin (0.02 mg/ml)

coating at 37°C in 5% CO<sub>2</sub>. Calcium video-microscopy was performed as previously described (Lesept *et al.*, 2016). Briefly, after 12 days *in vitro*, cultures were transferred into a serum-free HEPES-buffered saline solution and Fura-2-AM (10 μM) was loaded into the cells by incubation at 37°C for 45 min. Cells were then placed at room temperature, on the stage of a Leica DMI6000B inverted microscope equipped with a 150 W Xenon high stability lamp and a Leica 40×, 1.3 numerical aperture epifluorescence oil immersion objective (Wetzlar). Neurons received two consecutive stimulations with NMDA (50 μM, 30 s each) using a peristaltic pump. Neurons were then incubated for 45 min with sera from sham or GluN1<sub>359-378</sub> and two additional stimulations were performed (50 μM, 30 s each) in order to compare the response to what observed with the first stimulation. Fura-2 ratio images (excitation: 340, 380 nm, emission: 510 nm) were acquired with a Digital CMOS camera (Hamamatsu, ORCA-Flash2.8 C11440-10C) and digitized (2048 × 2048 pixels) using MetaFluor 6.1 software (Universal Imaging Corporation). For each cell, we calculated the area under the curve (AUC) of intracellular calcium influx before (AUCb) and after treatment (AUCa) so that each cell is its own control. Results are given as per cent of responsiveness  $f = [(AUCa)/(AUCb)] \times 100g$ , which gives a measure of the effect of the treatment with the different sera.

## Flow cytometry

Immunophenotyping of leucocytes was performed by flow cytometry from brain, spleen, lymph node and CSF. Cells were isolated using a cell strainer (Ø 40 mm, Falcon). Brain cells were centrifuged through by Percoll gradient (Sigma Aldrich) to remove myelin. Spleen cells were incubated with ammonium chloride to lyse red cell. Then, all sample were incubated with 1 ml of Fc-CD16-32 (BD Pharmingen) for 15 min at 4°C to block non-antigen-specific binding of immunoglobulins. The antibodies used for flow cytometry (all provided by BD Pharmingen and used at 0.2 mg/ml) were: BV421-Rat Anti-Mouse CD11b, APC-Rat Anti-Mouse CD4, PE-Cy7 Rat Anti-Mouse CD8a, FITC Rat Anti-Mouse CD45, PE-Cy7 Rat Anti-Mouse Ly-6G, APC Hamster Anti-Mouse CD11c, 0.2 mg/ml, BV421-Rat Anti-Mouse CD45/B220, APC-Rat Anti-Mouse CD138, APC Rat IgG2a K Isotype Control, PE-Cy7 Hamster Anti-Mouse CD3e, PE-Cy7 Hamster IgG1, K Isotype Control, FITC Rat Anti-Mouse CD45, BV421 Rat Anti-Mouse CD45R/B220 (BD Horizon 0.2 mg/ml). Experiments were performed on a FACSVerser™ (BD) and analysis was done using with FlowJo™ (7.6.5 version).

## B-cell depletion

B cells were depleted following a previously described method (Carmi *et al.*, 2015) by the injection of anti-mouse B220 (clone RA3.3A1/6.1, InVivoMab) and anti-mouse CD19 (clone 1D3, InVivoMab). Each antibody was injected intraperitoneally at a dose of 300 μg per injection, once a week for 4 weeks, starting 1 week before active immunization. Control animals were injected in the same manner with 600 μg of an isotype antibody (anti-trinitrophenol IgG2a isotype, clone 2A3, InVivoMab).

## Data availability

All data are available upon request by a qualified researcher.

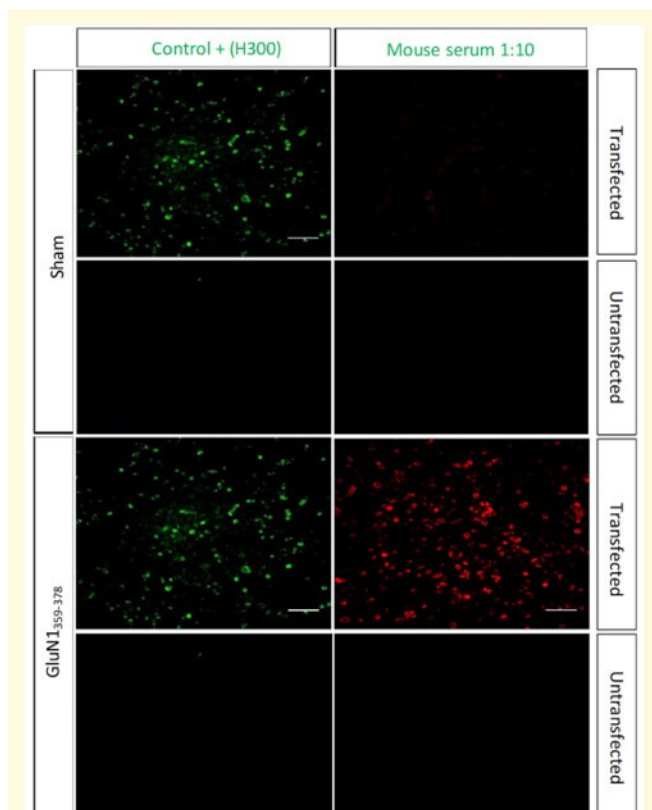
## Results

### Autoimmune response against GluN1 induces spatial memory impairment and anxiety-like behaviour

The primary objective of this study was to design an animal model reproducing the immune processes occurring in NMDAR encephalitis. To this end, we designed a protocol of active immunization against the region of GluN1 previously implicated in this disease (Gleichman *et al.*, 2012). Our first step was to design an immunogenic peptide including the N368/G369 region of GluN1, crucial for the development of immunoreactivity (Gleichman *et al.*, 2012). We used the BepiPred linear epitope prediction method ([www.iedb.org](http://www.iedb.org)) to assess the theoretical immunogenicity of several peptides encompassing this region of GluN1 (Supplementary Table 1). The criteria for design was that the peptide would have a high theoretical immunogenicity, and would include the N368/G369 amino acids in a central position. The GluN1<sub>359-378</sub> peptide (RKLQVGIYNGTHVIPNDRK) fulfilled these two criteria (Supplementary Table 1) and was thus used for immunization for the rest of the study. We immunized mice with this peptide in an immunogenic adjuvant cocktail typically used to induce a T-cell (Fournier *et al.*, 2017) or B-cell mediated (Whittaker Hawkins *et al.*, 2017; Michel *et al.*, 2019) autoimmune response in mice. We extracted sera from these mice and used them to stain HEK-293 cells transfected with NMDAR subunits, a method classically used to detect circulating anti NMDAR autoantibodies (aNMDAR-Ab) in human diagnosis. This showed that animals immunized with the GluN1<sub>359-378</sub> peptide, but not sham animals, produced circulating aNMDAR-Ab (Fig. 1).

Then, we addressed whether this autoimmune challenge (Fig. 2A) induces behavioural changes that may reproduce part of the symptoms observed in NMDAR encephalitis. Two weeks after immunization, GluN1<sub>359-378</sub> immunized mice entered less often ( $P = 0.018$ ) and spent less time ( $P = 0.002$ ) than sham mice in the open arms of the O-maze (respectively,  $n = 10$  and  $n = 12$ ; Fig. 2B and C), and showed an increased latency time ( $P = 0.00001$ ) before entering the open arms (Fig. 2D). They also stayed immobile for a longer time than sham mice in the swimming test ( $I = 0.0004$ ,  $n = 10$  in each group; Fig. 2E). These two sets of experiments are evocative of an anxious and depressive-like behaviour in GluN1<sub>359-378</sub> mice. Next, sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice were subjected to the Y-maze test to assess spatial memory. During the acquisition phase, the total number of visits into the two free access arms was equivalent for sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice (see 'Materials and methods' section). During the test phase, sham mice discriminated the newly open arm and the two familiar arms correctly, as they visited significantly more often the new arm than the





**Figure 1** Validation of immunization. Immunostaining of HEK293 cells ( $n = 3$ ) transfected with GluN1a and GluN2B subunits after incubation with serum of sham mice or GluN1<sub>359-378</sub> mice (revealed by anti-mouse IgG coupled to Cy3, red), or with a commercial anti-GluN1 antibody (H300, revealed by anti-rabbit IgG coupled to FITC, green). Scale bars = 100  $\mu$ m.

familiar arms (arms 1 and 2) ( $P = 0.028$  and  $P = 0.006$ , respectively,  $n = 12$ ; Fig. 2F). This indicates good spatial memory in sham mice. In sharp contrast, GluN1<sub>359-378</sub> mice failed to discriminate between new and familiar arms, as they visited the new arm significantly less often than the familiar arms ( $P = 0.018$  for both,  $n = 10$ ; Fig. 2F). These results reveal a deficit of spatial memory in GluN1<sub>359-378</sub>. Active immunization with a control peptide (Fig. 3A and Supplementary Table 2) did not induce any behavioural changes in the O-maze ( $P = 0.84$ ,  $P = 0.12$  and  $P = 0.67$ , respectively; Fig. 3B–D) or in the Y-maze (new arm versus arm 1:  $P = 0.007$ , new arm versus arm 2:  $P = 0.023$ ; Fig. 3E). Global motor activity (horizontal or vertical) was not influenced by active immunization with GluN1<sub>359-378</sub> (horizontal:  $P = 0.63$ , vertical:  $P = 0.91$ ,  $n = 10$  in each group; Fig. 2G and H) or with the control peptide (horizontal:  $P = 0.73$ , vertical  $P = 0.91$ ,  $n = 10$  in each group; Fig. 3F and G) as compared to sham mice.

Our next step was to test whether active immunization with GluN1<sub>359-378</sub> could induce epileptogenic effects, a symptom of human NMDAR encephalitis (Geis *et al.*, 2019) reproduced after passive transfer of NMDAR antibodies in

mouse models (Wright *et al.*, 2015). The injection of PTZ resulted in epileptic like behavioural signs ranging from motionless staring (stage 1) to convulsions (stages 5) (Fig. 4A–E). The number of stage 4 ( $P = 0.035$ ;  $n = 10$  in each group, Fig. 4C) and the average cumulative score after 60 min ( $P = 0.035$ ; Fig. 4E) were increased in GluN1<sub>359-378</sub> mice.

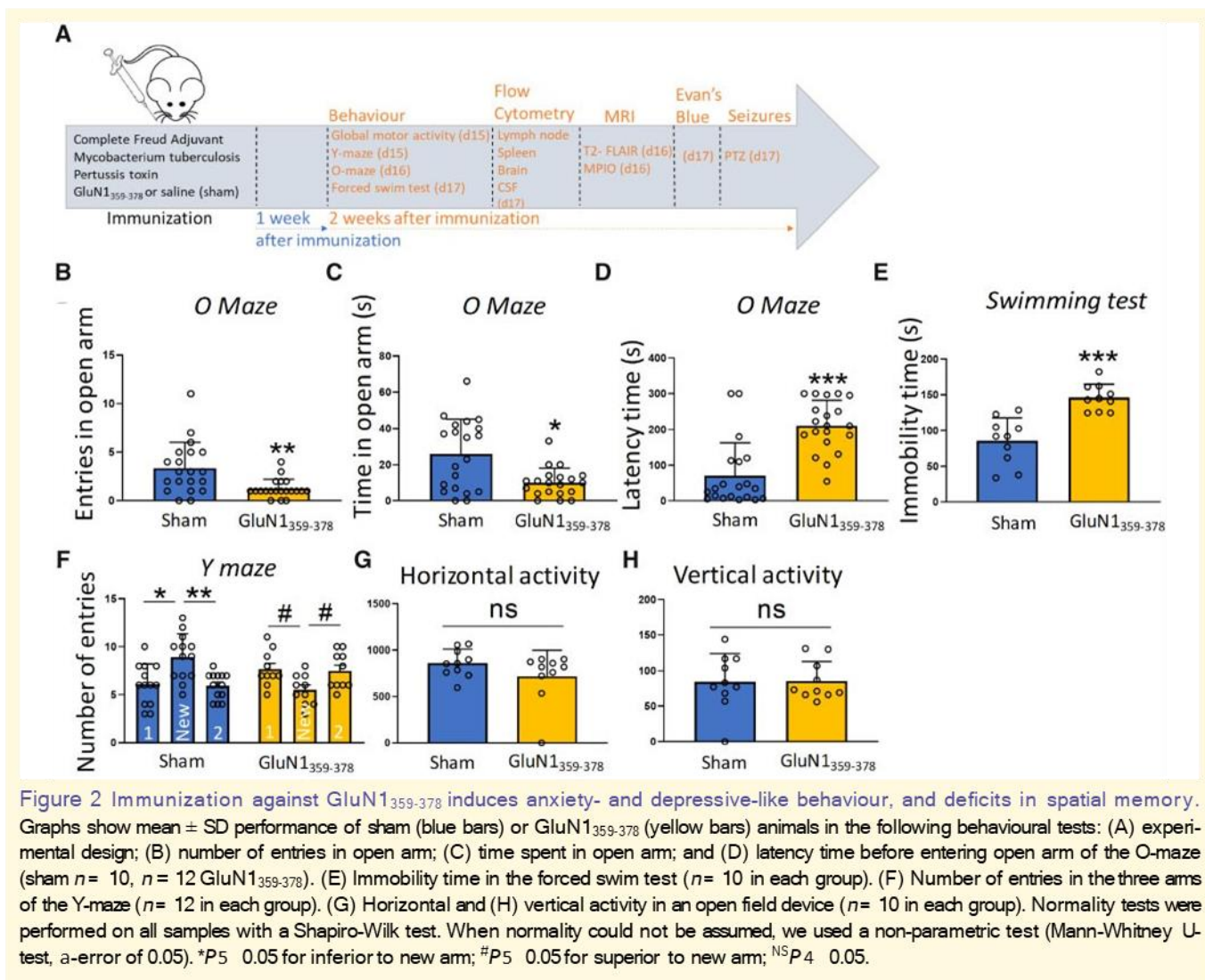
We then assessed the general pathological markers induced by active immunization in GluN1<sub>359-378</sub> mice. GluN1<sub>359-378</sub> mice showed diffuse MRI T2-FLAIR hyperintensities in the brain, particularly at perivascular locations (Fig. 5A). GluN1<sub>359-378</sub> mice also showed an increase in blood–brain barrier permeability, revealed by Evan’s blue extravasation, within the whole brain (Fig. 5B and corresponding quantification:  $P = 0.028$ ,  $n = 4$  in each group; Fig. 5C). Protein concentration was increased in the CSF of GluN1<sub>359-378</sub> mice ( $P = 0.029$ ,  $n = 10$  in each group; Fig. 5D), where anti-NMDAR IgG were detected (Fig. 5E). Finally, IgG deposits were observed within the brain parenchyma, around the ventricles and in the hippocampal region (Fig. 5F). These different pathological signs occurred in the absence of positive immunostaining for the neuronal degeneration marker, Fluoro-Jade<sup>C</sup> (Fig. 5G).

These data show that the immunization against GluN1<sub>359-378</sub> induces an autoimmune response that drives structural and behavioural impairments reminiscent of several key aspects of anti-NMDAR encephalitis.

Our next step was to explore whether the antibodies produced by the mice after immunization against GluN1<sub>359-378</sub> may influence NMDAR function. To this end, we studied the dynamics of calcium influx into cultured neurons induced by NMDA stimulation by using calcium video-microscopy (Fig. 5H–J). After two reference NMDA-induced spikes (50 mM, 30 s), neurons were incubated with the sera from sham or GluN1<sub>359-378</sub> mice for 45 min. At the end of the incubation period, neurons were stimulated again (two stimulations with 50 mM NMDA for 30 s). Incubation with serum from GluN1<sub>359-378</sub> mice strongly reduced the amplitude of NMDA-induced spike, while incubation with serum from sham mice had limited effects (Fig. 5H). The responsiveness compared to the first two peaks (Fig. 5I) and the global calcium response (AUC; Fig. 5J) were strongly reduced after incubation with serum from GluN1<sub>359-378</sub> mice ( $P = 0.00001$ ) as compared to incubation with serum from sham mice.

## Experimental NMDAR autoimmune encephalitis is mediated by a B-cell response

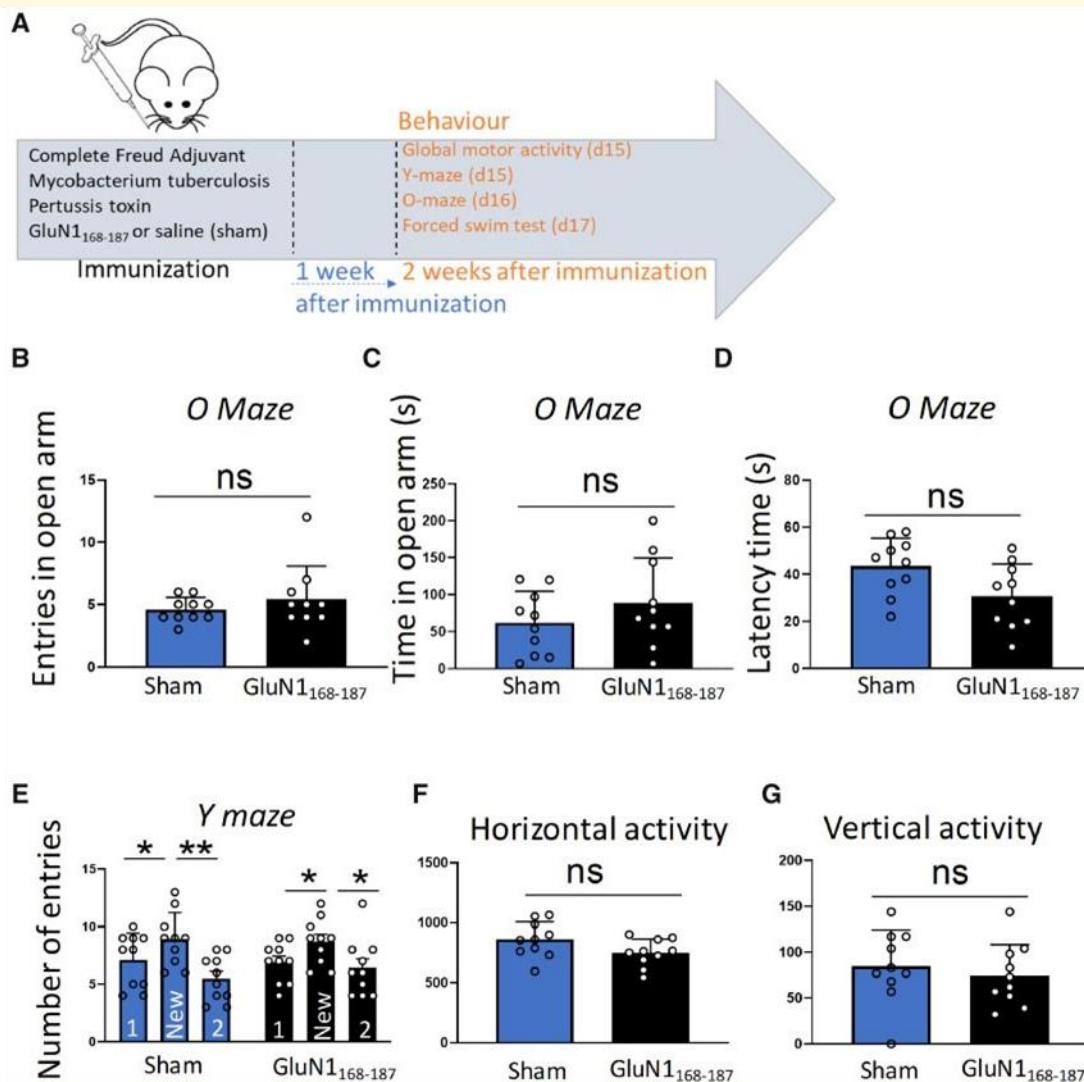
At the histological level, fibrinogen extravasation illustrated the increase in blood–brain barrier permeability in the hippocampal region of GluN1<sub>359-378</sub> animals (Fig. 6A). To address whether this increase in blood–brain barrier permeability was important for the development of the behavioural impairments, we immunized a series of animals without injecting pertussis toxin (Supplementary Fig. 1A). In this case, in



which no overt Evan's blue extravasation could be observed ([Supplementary Fig. 1B](#)), anxiety-like behaviour was absent (entries:  $P = 0.35$ , time in open arms:  $P = 0.97$ , latency time:  $P = 0.53$ ;  $n = 10$  in each group; [Supplementary Fig. 1C and E](#)) and spatial memory impairments were less marked (new arm versus arm 1:  $P = 0.007$ , new arm versus arm 2:  $P = 0.012$ ,  $n = 15$  in each group; [Supplementary Fig. 1F](#)). The increase in blood-brain barrier was not associated with endothelial expression of adhesion molecules, assessed here by molecular MRI for P-selectin ([Fig. 6B](#)), in contrast to what is observed in other models of CNS-directed autoimmune diseases ([Fournier et al., 2017](#)). In line with this, few if any T-cell infiltration was observed at sites of overt blood-brain barrier permeabilization ([Fig. 6C](#)), in contrast to what is observed in other models of CNS-directed autoimmune diseases such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) ([Fig. 6D](#)). This absence of T-cell infiltration was confirmed by flow cytometry from the whole dissociated brain ([Fig. 6E](#) and corresponding quantification: CD4:  $P = 0.46$ , CD8:  $P = 0.082$ ,  $n = 5$  (sham) and 6 (GluN1<sub>359-378</sub>); [Fig. 6F](#)).

In contrast, a significant increase in B cell population, identified as B220<sup>+</sup> cells, was observed in the whole dissociated brain of GluN1<sub>359-378</sub> ([Fig. 7A](#) and corresponding quantification:  $P = 0.008$ ,  $n = 5$  and 6, respectively; [Fig. 7B](#)), reaching ~30% of CD45<sup>+</sup> leucocytes. Interestingly, B cells were not found within the parenchyma ([Fig. 7C](#)), but rather in the meninges ([Fig. 7D](#)), ventricles ([Fig. 7E](#)), choroid plexus ([Fig. 7F](#)) and in the form of cell aggregates ([Fig. 7G](#); corresponding quantification: meninges:  $P = 0.009$ , choroid plexus:  $P = 0.012$ , ventricles:  $P = 0.011$ , hippocampus:  $P = 1$ ,  $n = 5$  in each group; [Fig. 7H](#)). In addition, although B cells were rarely found in the CSF of sham animals, their number was increased in the CSF of GluN1<sub>359-378</sub> animals ([Fig. 7I](#)). Further, a substantial number of these cells matured into CD138<sup>+</sup> cells (plasma cells) ([Fig. 7J](#)). In sham animals, the vast majority (87%) of CD45<sup>+</sup> cells (leucocytes) were CD3<sup>+</sup> positive cells (T lymphocytes), while within the remaining population of CD3<sup>-</sup> cells, only 11.4% of cells were B220<sup>+</sup> (B cells) and 10.4% were CD138<sup>+</sup> (plasma cells) ([Fig. 7K](#)). In contrast, in GluN1<sub>359-378</sub> mice, only half of CD45<sup>+</sup> cells





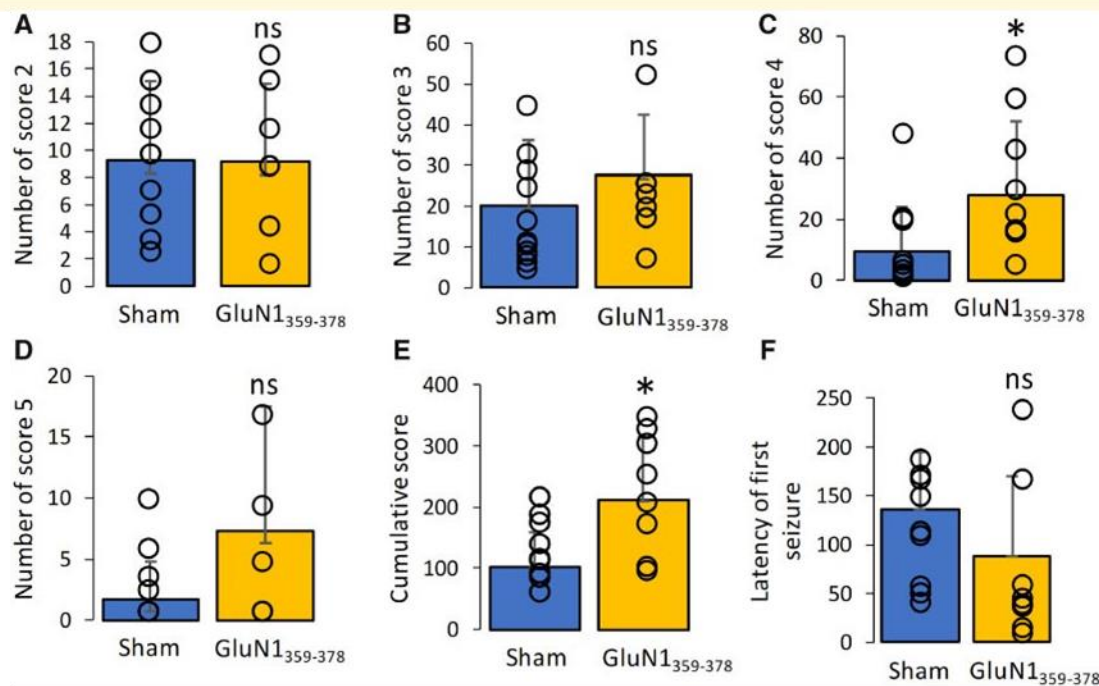
**Figure 3** Immunization against a control peptide does not induce behavioural deficits. (A) Experimental design. (B–G) Graphs show mean  $\pm$  SD performance of sham (blue bars) or GluN1<sub>168-187</sub> (black bars) animals in the following behavioural tests: (B) number of entries in open arm; (C) time spent in open arm; and (D) latency time before entering open arm of the O-maze ( $n = 10$  in each group). (E) Number of entries in the three arms of the Y-maze ( $n = 10$  in each group); (F) horizontal and (G) vertical activity in an open field device ( $n = 10$  in each group). Normality tests were performed on all samples with a Shapiro-Wilk test. When normality could not be assumed, we used a non-parametric test (Mann-Whitney U-test,  $\alpha$ -error of 0.05). \* $P \leq 0.05$ ; <sup>NS</sup> $P > 0.05$ .

(leucocytes) were CD3<sup>+</sup> cells (T lymphocytes), and within the remaining population of CD3<sup>-</sup> cells, 33% of cells were B220<sup>+</sup> (B cells) and 27.2% were CD138<sup>+</sup> (plasmocytes) (Fig. 7K).

Some changes were observed in the myeloid populations (Supplementary Fig. 2; sham:  $n = 5$ , GluN1<sub>359-378</sub>:  $n = 6$ ). The LY6G<sup>+</sup> population (neutrophil phenotype) was increased in the brain ( $P = 0.008$ ), cervical lymph nodes ( $P = 0.0035$ ) and unchanged in the spleen ( $P = 0.78$ ) at Week 2 post-immunization (Supplementary Fig. 2A–C). Most myeloid cells were CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup> cells (microglia/macrophages phenotype), while CD11b<sup>-</sup>/CD11c<sup>+</sup> cells and CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>+</sup> cells (dendritic cell phenotypes) were found in low numbers (51% of leucocytes; Supplementary

Fig. 2D). CD11b<sup>+</sup>/CD11c<sup>-</sup> cells were increased in the brain ( $P = 0.013$ ) and cervical lymph nodes ( $P = 0.008$ ) of GluN1<sub>359-378</sub> mice (Supplementary Fig. 2D and E), but not in the spleen (Supplementary Fig. 2) at that stage.

An increase in B cells and plasma cells in the CSF was only observed at 2 weeks after immunization, which corresponds to the symptomatic phase of the model. At 1 week after immunization, circulating antibodies were detected with less intensity (Supplementary Fig. 3A) than at 2 weeks post-immunization in GluN1<sub>359-378</sub> mice, and symptoms were still absent (Supplementary Fig. 3B–E). There was no increase in B cell population in the CSF of GluN1<sub>359-378</sub> mice as compared to sham animals neither in the whole dissociated brain (Supplementary Fig. 3F and corresponding



**Figure 4** Immunization against GluN1<sub>359-378</sub> increases sensitivity to pharmacologically-induced epilepsy. Graphs show mean  $\pm$  SD manifestations of sham (blue bars,  $n = 10$ ) or GluN1<sub>359-378</sub> (yellow bars,  $n = 10$ ): (A–D) Number of epileptic events at respective stage (A: stage 2; B: stage 3; C: stage 4; D: stage 5). (E) Cumulative epilepsy score. (F) Latency time before first epileptic event. Normality tests were performed on all samples with a Shapiro-Wilk test. When normality could not be assumed, we used a non-parametric test (Mann-Whitney U-test,  $\alpha$ -error of 0.05). \* $P \leq 0.05$ ; <sup>NS</sup> $P > 0.05$ .

quantification [Supplementary Fig. 3G](#)) nor in the CSF ([Supplementary Fig. 3H](#) and corresponding quantification, [Supplementary Fig. 3J](#)), where no CD138<sup>+</sup> plasma cells were detected ([Supplementary Fig. 3I](#) and corresponding quantification, [Supplementary Fig. 3J](#)).

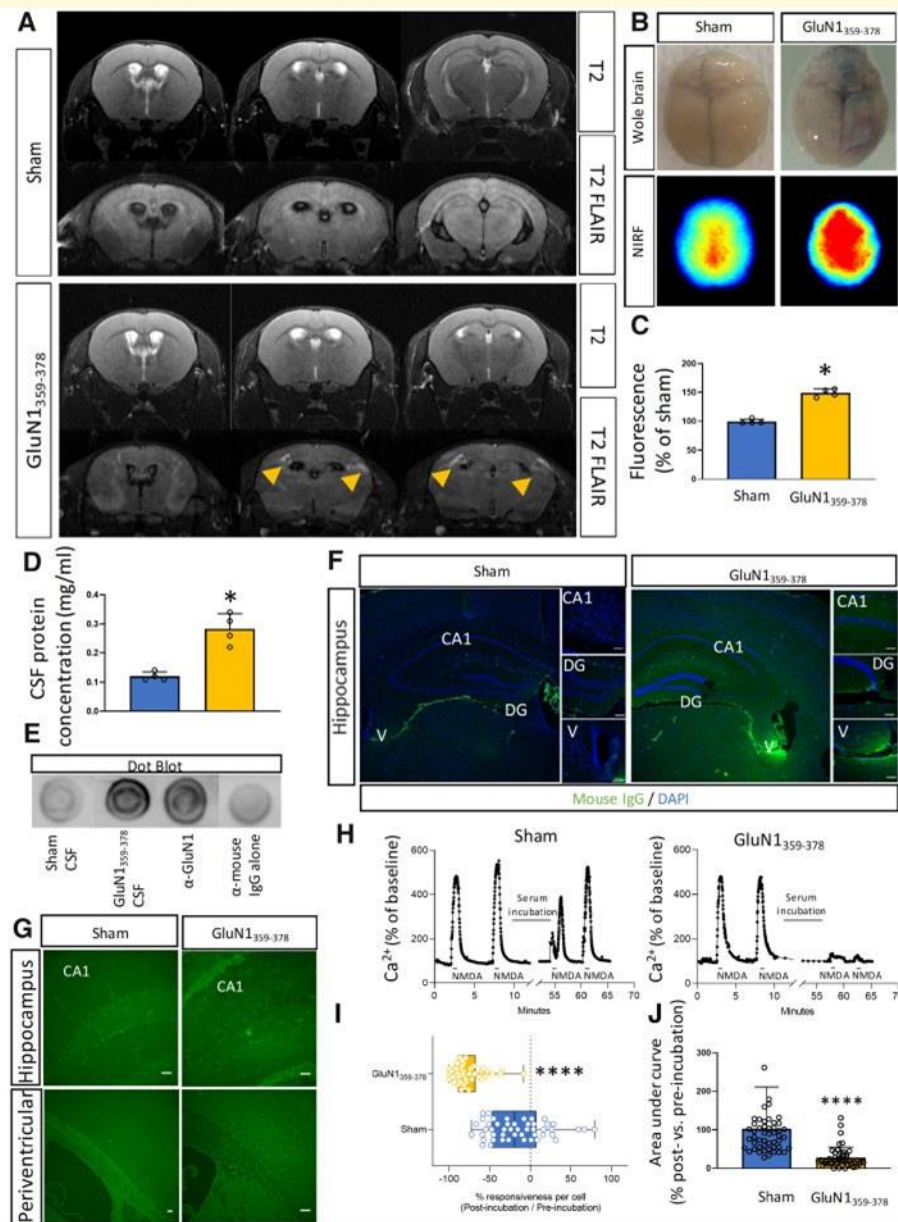
At 1 week after immunization, B220<sup>+</sup> B cells ( $P = 0.03$ ), CD8<sup>+</sup> T cells ( $P = 0.03$ ) or CD4<sup>+</sup> T cells ( $P = 0.03$ ) were increased in the spleen of GluN1<sub>359-378</sub> mice ( $n = 6$ ) as compared to sham mice ( $n = 5$ ) ([Supplementary Fig. 4A and E](#)). At 2 weeks after immunization, the number of B cells in the spleen of GluN1<sub>359-378</sub> mice went back to the level of sham mice ( $P = 0.64$ ), while the number of T4 ( $P = 0.008$ ) and T8 ( $P = 0.008$ ) cells decreased as compared to sham mice ([Supplementary Fig. 4B and F](#)). No difference in B cells ( $P = 0.19$ ) or T cells ( $P = 0.11$ ) were observed in cervical lymph node at 1 week ([Supplementary Fig. 4C and G](#)) or 2 weeks ([Supplementary Fig. 4D and H](#)) after immunization.

The above data suggest that anti-NMDAR encephalitis in GluN1<sub>359-378</sub> mice was mediated by a B-cell response. To verify this hypothesis, we depleted B cells by four injections (one injection every week) of B220 and CD19 antibodies ([Carmi et al., 2015](#)) beginning 1 week before active immunization with GluN1<sub>359-378</sub> ([Fig. 8A](#)). This led to the depletion of B cells and plasmocytes, still observed at the end of the protocol (2 weeks after the last injection of depleting antibodies) ([Fig. 8B, C](#) and corresponding quantification,

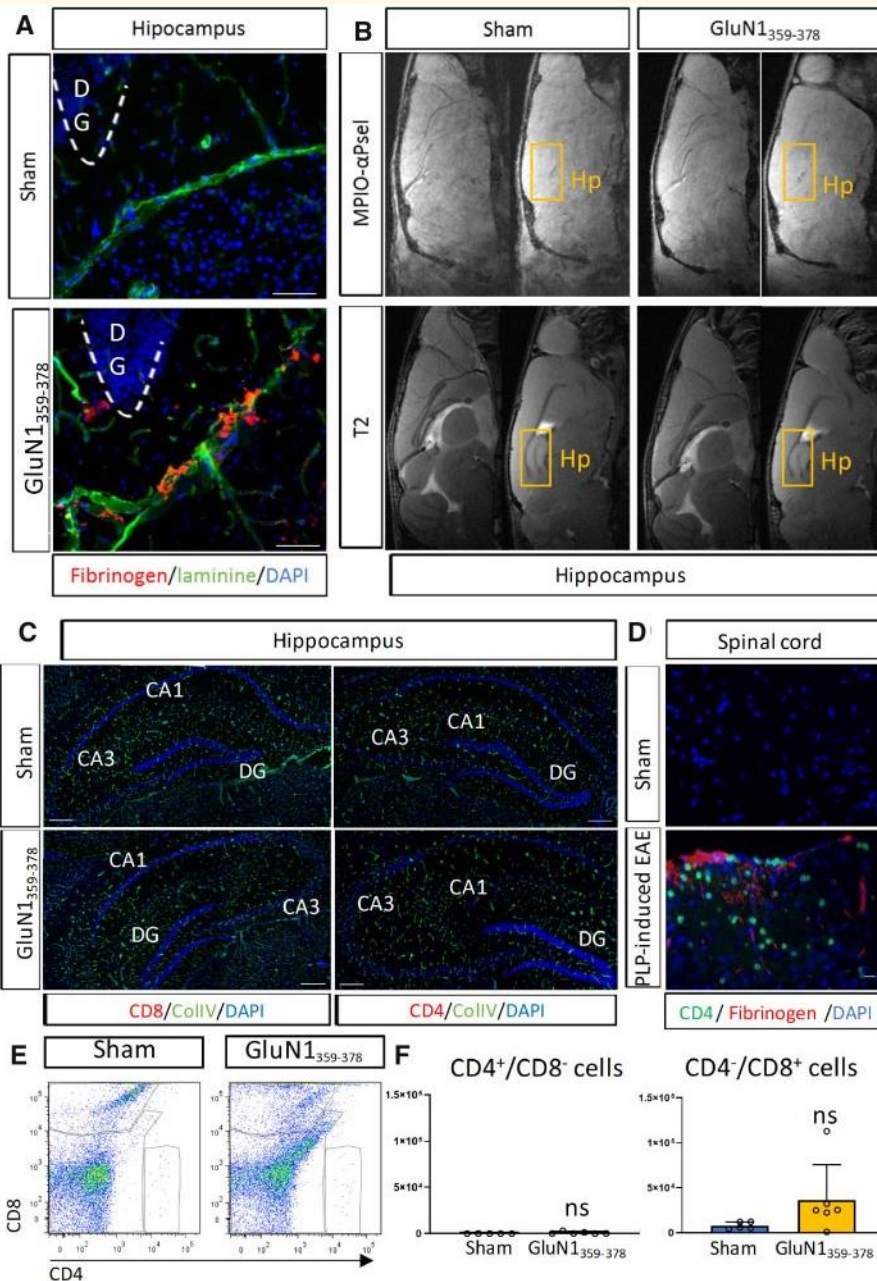
[Fig. 8E](#)), without affecting T cells ([Fig. 8D](#) and corresponding quantification, [Fig. 8E](#)).

Our next step was to assess how B-cell depletion affects the behaviour of GluN1<sub>359-378</sub> mice. Although B-cell depletion did not affect anxiety-like behaviour [entries:  $P = 0.11$ , time in open arms:  $P = 0.15$  and latency time:  $P = 1$ ,  $n = 10$  (isotype) and 9 (depleted); [Fig. 8F–H](#)], it reduced depressive-like behaviour, as B-cell-depleted GluN1<sub>359-378</sub> mice stayed immobile for a shorter time than isotype-injected GluN1<sub>359-378</sub> mice ( $P = 0.002$ ; [Fig. 8I](#)) in the swimming test. Y-maze experiments were used to assess whether B-cell depletion may also prevent the spatial memory deficit observed in GluN1<sub>359-378</sub> mice. When injected with control isotype, GluN1<sub>359-378</sub> mice failed to discriminate between new and familiar arms, as they visited the new arm as often as the familiar arms ( $P = 0.13$  and  $P = 1$ ; [Fig. 8J](#)). This indicates impairment of spatial memory in isotype-injected GluN1<sub>359-378</sub> mice. However, GluN1<sub>359-378</sub> mice depleted of B cells recover their ability to discriminate between new and familiar arms, as they visited significantly more often the new arm than the familiar arms ( $P = 0.01$  and  $P = 0.007$ ; [Fig. 8J](#)). These results indicate that the deficit of spatial memory in GluN1<sub>359-378</sub> is prevented when mice are depleted of B cells. Global motor activity (horizontal or vertical) was the same in isotype-injected or B-cell-depleted GluN1<sub>359-378</sub> mice ([Fig. 8K and L](#)), which discards an influence of motor activity in the above observations.





**Figure 5** Pathological markers of encephalitis after immunization against GluN1<sup>359-378</sup>. (A) Representative images ( $n = 5$ ; nine slices per brain) of T<sub>2</sub>-FLAIR MRI of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice. Arrows show periventricular lesions. (B) Representative images; and (C) corresponding quantification of fluorescence (mean  $\pm$  SD) in brains of sham (blue bars) and GluN1<sup>359-378</sup> (yellow bars) mice ( $n = 4$  in each group) after Evan's blue injection to assess blood-brain barrier integrity. (D) Total protein concentration (mean  $\pm$  SD) in the CSF of sham (blue bars) and GluN1<sup>359-378</sup> (yellow bars) mice ( $n = 10$  in each group). (E) Immunoblotting using CSF from sham GluN1<sup>359-378</sup> mice to detect the amino-terminal domain of GluN1. GluN1 antibody (Lesept *et al.*, 2016), an antibody directed against GluN1, was used as a positive control. The dot blot was revealed by anti-mouse IgG. Negative control was performed by omitting the primary serum (anti-mouse IgG alone). (F) Representative images mice ( $n = 3$  in each group, three anatomical sections: caudal, medial, rostral) of immunostaining for mouse IgG in the brain of sham and GluN1<sup>359-378</sup>. (G) Representative image of Fluoro-Jade<sup>C</sup> staining in the brain (hippocampus and perivascular zones) of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice ( $n = 3$  in each group). (H) Neurons were stimulated twice with NMDA (50 mM, 30 s) at times indicated in the figure before and after incubation with serum from sham or GluN1<sup>359-378</sup> mice. Variations of mean calcium concentration in individual neurons (sham,  $n = 48$ ; GluN1<sup>359-378</sup>,  $n = 46$ ; from three independent experiments) were measured by Fura-2 videomicroscopy and are expressed as percentage of basal level. (I) Graphs show percentage of responsiveness of each neuron after serum incubation (comparison of the AUC of calcium peaks after and before serum incubation, see 'Materials and methods' section). (J) Graphs show mean  $\pm$  SEM AUC of NMDA induced calcium peaks in neurons after incubation with serum from sham or GluN1<sup>359-378</sup> mice (sham,  $n = 48$ ; GluN1<sup>359-378</sup>,  $n = 46$ ; from three independent experiments).  $P < 0.00001$ , Mann-Whitney U-test. Scale bar = 50  $\mu$ m in G.



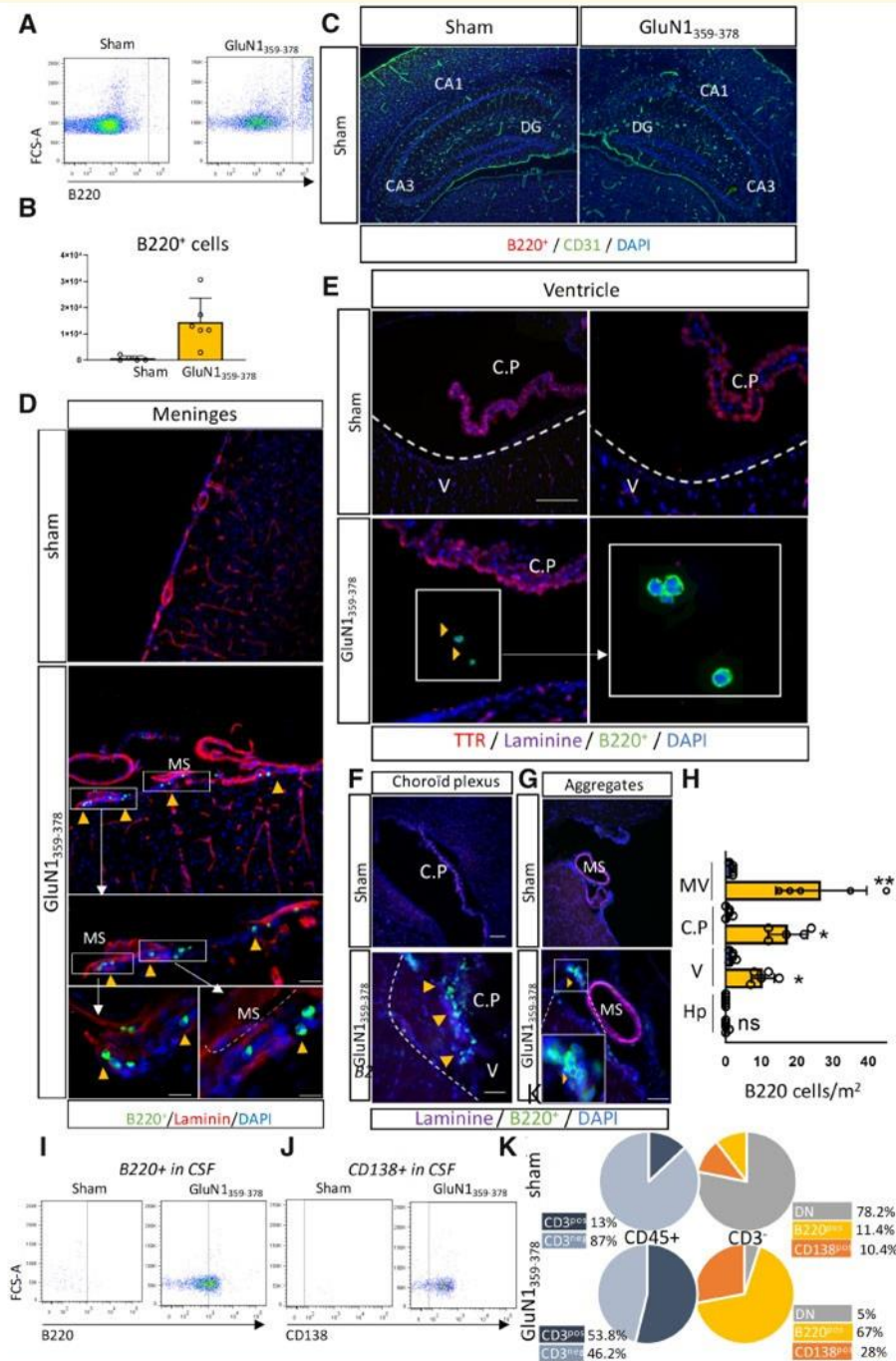
**Figure 6** Anti-NMDAR encephalitis occurs without overt T-cell recruitment. (A) Photomicrographs show staining for laminin (vessels, green) and fibrinogen (index of blood-brain barrier leakage, red) in the hippocampus of sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). DG = dentate gyrus. Scale bar = 50 nm. Representative image from  $n = 3$  in each group. (B) MRI images of brains from sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice. *Top*: Molecular imaging after injection of MPIOs coupled to anti-P-selectin antibodies (MPIO- $\alpha$ Psel). *Bottom*: T<sub>2</sub>-weighted images. Hp = hippocampus. (C) Photomicrographs show staining for Collagen IV (vessels, green), CD4 and CD8 (lymphocytes, red) in the hippocampus of sham and GluN1<sub>359-378</sub> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). DG = dentate gyrus. Scale bar = 150 nm. Representative image from  $n = 3$  in each group. (D) Photomicrographs show staining for CD4 (lymphocytes, green) and fibrinogen (index of blood-brain barrier leakage, red) in the spinal cord of sham and PLP-induced EAE mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 150 nm. Representative image from  $n = 3$  in each group. (E) Flow cytometry for CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> cells (T lymphocytes) from sham and GluN1<sub>359-378</sub> mouse brains and (F) corresponding quantification (sham,  $n = 5$ ; GluN1<sub>359-378</sub>,  $n = 6$ ).

## Discussion

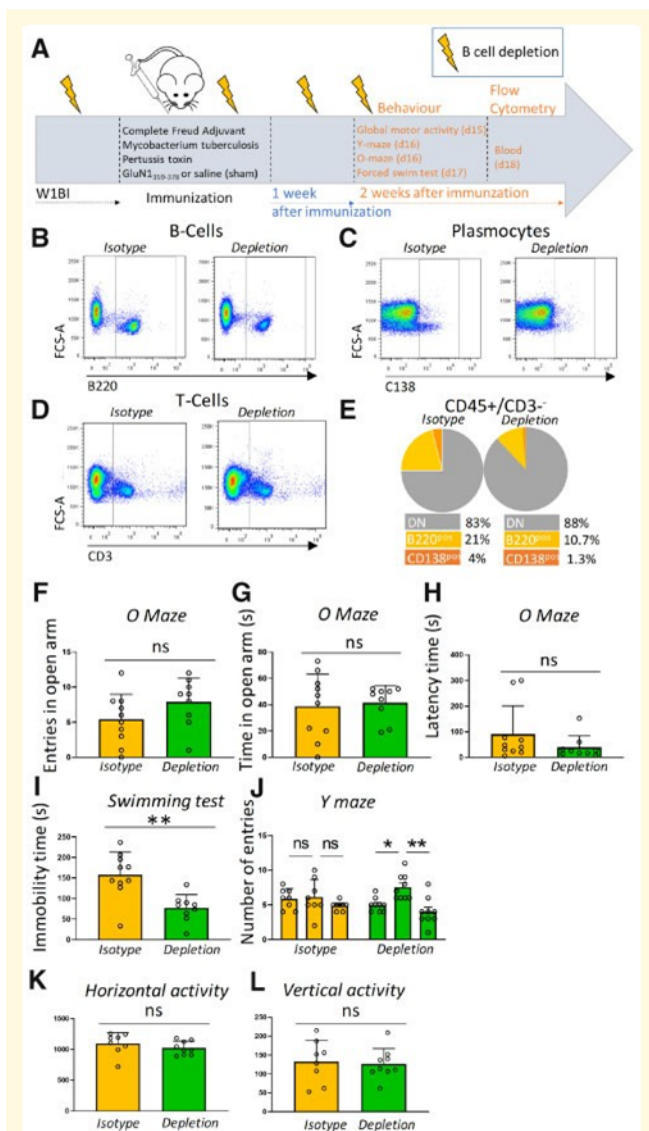
This study describes that active immunization of mice against GluN1<sub>359-378</sub> induces a B-cell-mediated autoimmune

response targeting the CNS. This response features an infiltration of B-cells into the meninges, periventricular spaces and ventricles, where they differentiate into plasmocytes. This reaction is associated with encephalopathy





**Figure 7** Anti-NMDAR encephalitis occurs with B cell infiltration via leptomenigeal and circumventricular pathways. (A) Flow cytometry for B220<sup>+</sup> cells (B lymphocytes) from sham and GluN1<sup>359-378</sup> mouse brains and (B) corresponding quantification (*n* = 5 and 6, respectively). (C) Photomicrographs show staining for CD31 (vessels, green) and B220 (B lymphocytes, red) in the hippocampus of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Note the absence of B220<sup>+</sup> staining. Scale bar = 150 nm. Representative image from *n* = 3 in each group. (D) Photomicrographs show staining for laminin (vessels, red) and B220 (B lymphocytes, green) in the meninges of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 150 nm (top) and 20 nm (bottom). Representative image from *n* = 3 in each group. (E-G) Photomicrographs show staining for Laminin (vessels, magenta), TTR (choroid plexus, red) and B220 (B lymphocytes, green) in the ventricles (E), choroid plexus (F) and B cell aggregates (G) of sham and GluN1<sup>359-378</sup> mice. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). Scale bar = 150 nm (top) and 20 nm (bottom). Representative image from *n* = 5 in each group. (H) Corresponding quantification. CP = choroid plexus; Hp = hippocampus; MV = meningeal vessel; V = ventricle. (I-K) Flow cytometry for B200<sup>+</sup> (B lymphocytes) and CD138<sup>+</sup> (plasmocytes) and corresponding quantifications (*n* = 3 pools of five CSF in each group).



**Figure 8** B-cell depletion prevents the progression of anti-NMDAR encephalitis. (A) Experimental design. (B–D) Flow cytometry for (A) B220<sup>+</sup> (B lymphocytes), (B) CD138<sup>+</sup> (plasmacytes) and (C) CD3<sup>+</sup> (T lymphocytes). (E) Corresponding quantifications ( $n = 4$  in each group). (F) Number of entries in open arm, (G) time spent in open arm and (H) latency time before entering open arm of the O-maze (isotype,  $n = 10$ ; depleted,  $n = 9$ ). (I) Immobility time in the forced swim test ( $n = 9$  in each group). (J) Number of entries in the three arms of the Y-maze (isotype,  $n = 10$ ; depleted,  $n = 9$ ). (K) Horizontal and (L) vertical activity in an open field device (isotype,  $n = 10$ ; depleted,  $n = 9$ ). Graphs show mean  $\pm$  SD performance of GluN1<sub>359-378</sub> mice with B-cell depletion (green bars) or isotype injection (yellow bars). Normality tests were performed on all samples with a Shapiro-Wilk test. When normality could not be assumed, we used a non-parametric test (Mann-Whitney U-test,  $\alpha$ -error of 0.05). \* $P < 0.05$  inferior to new arm; # $P < 0.05$  superior to new arm; <sup>NS</sup> $P > 0.05$ .

behavioural impairments. This paradigm provides a novel immune-mediated model of anti-NMDAR encephalitis that could be complementary to the existing models (Planaguma *et al.*, 2015; Pan *et al.*, 2019). It should be used in further studies to dissect the autoimmune processes leading to the intrathecal production of these antibodies and the mechanisms of their action. It could also provide a platform to test therapeutic strategies targeting the immune system in anti-NMDAR encephalitis.

Mice subjected to this paradigm show symptoms that are reminiscent of human anti-NMDAR encephalitis: memory impairments, anxiety- and depressive-like behaviours, and increased sensitivity to seizures. These symptoms are similar to those observed in previous works (Planaguma *et al.*, 2015; Wright *et al.*, 2015), despite distinct experimental paradigms. Interestingly, serum from GluN1<sub>359-378</sub> mice strongly reduced NMDA-induced calcium influx *in vitro*, which supports the relevance of the autoantibodies produced in this model and gives a possible link with the symptoms observed *in vivo*. Overall, it confirms that an immune reaction against NMDAR can lead to adverse effects *in vivo*, whatever the way this reaction is induced: direct injection or infusion of antibodies into the ventricles (Planaguma *et al.*, 2015; Malviya *et al.*, 2017; Taraschenko *et al.*, 2019), stereotactic injection of patient CSF into the parenchyma (Blome *et al.*, 2018), or active immunization, as is the case in the present work.

Interestingly, only anti-NMDAR antibodies from patients, but not from healthy subjects, induce synapse disorganization (Jezequel *et al.*, 2017) and the effect of CSF from different patients induce variable effects (Blome *et al.*, 2018). This suggests that the epitope targeted by these antibodies is critical. Accordingly, active immunization or injection of anti-NMDA antibodies targeting other epitopes than the one involved in encephalitis have provided beneficial effects in models of brain haemorrhage (Gaberel *et al.*, 2013), ischaemic stroke (Macrez *et al.*, 2011) or multiple sclerosis (Macrez *et al.*, 2016). In the present study, active immunization against the amino acids 168 to 187 of the NMDA receptor—a site of positive regulation of NMDAR function (Lesept *et al.*, 2016)—did not induce any encephalitogenic effects. This observation in our experimental context contrasts with an earlier study describing that human circulating anti NMDAR antibodies (purified from healthy donors or from patients with schizophrenia, anti-NMDA encephalitis or hypertension) act regardless of their target epitope to induce NMDAR dysfunction (Castillo-Gómez *et al.*, 2017). This previous work may not exhaustively reflect the full variety of epitopes targeted by naturally occurring, autoreactive anti-NMDAR antibodies in humans. Further studies in a larger number of patients may resolve this point.

Of note, when injected intravenously in mice, human circulating anti-NMDAR antibodies induce effects on motor activity, but this occurs only when the blood–brain barrier permeability is impaired (Hammer *et al.*, 2014). This underlines the fact that anti-NMDAR antibodies must reach the CNS to induce their deleterious effects. In contrast, some

characterized by blood–brain barrier opening, periventricular FLAIR hyperintensities and IgG deposits. Two weeks after immunization, mice develop cognitive, emotional and



actions of anti-NMDAR antibodies outside the CNS, such as modulation of endothelial NMDAR activity, can provide beneficial effects in neuroinflammatory context (Macrez *et al.*, 2016). Further studies should address whether anti-NMDAR autoantibodies may interfere with described functions of non-neuronal NMDAR (Hogan-Cann and Anderson, 2016) in animal models of anti-NMDAR encephalitis.

Overall, these different points of discussion indicate that anti-NMDAR antibodies can provide various effects (beneficial, neutral or deleterious) depending on their target epitope, the context (healthy versus neuroinflammation), the localization of their action (intra- versus extra-CNS) or their target cell (neural versus non neural cells).

The behavioural impairments observed in the present study are more pronounced than those reported previously with a different paradigm (Pan *et al.*, 2019): these deficits are multiple (anxiety- and depressive-like behaviours, spatial memory impairment and increased sensitivity to seizures) and they occur spontaneously (in the absence of injection of the NMDA antagonist MK801). These differences could be linked to differences in the experimental design, including the target peptide (a single peptide focusing on N368/G369 versus four different peptides distributed on GluN1 extracellular sequence). Interestingly, one of these four peptides encompasses the same amino acids as the one used in the present study, which may indicate that other factors, besides the epitope, could be relevant in determining the effects of the antibodies, particularly in animal models. Another important difference with this previous study is the age (8–10-week-old mice versus 12-month-old mice). This latter parameter is likely to be critical, as the migration of B cells and their ability to produce antibodies is impaired as mice age (Turner and Mabbott, 2017). In line with this, anti-NMDAR encephalitis mostly affects young patients.

In the present study, NMDAR encephalitis is mediated by a B-cell response, without parenchyma infiltration or contribution of T cells. These findings are in contrast with another recent model (Jones *et al.*, 2019) in which mature T cells as well as antibody-producing cells were required for disease induction. A major difference in the study design was the material used for immunization and may explain this dissimilarity in the pathological mechanisms: in this previous study, mice were immunized with GluN1/GluN2B NMDA fully-assembled tetrameric receptors embedded in liposomes, in contrast to the small peptides injected without carriers in the present work. This indicates that different study designs can model NMDA encephalitis with a different respective involvement of B- or T-cell responses. The complementarity of these models gives interesting perspectives for further studies.

In any case, our study confirms the observation that the symptoms can occur in the absence of overt T cell and myeloid cell responses (Pan *et al.*, 2019) and brings an important new element by the description of a B-cell response after active immunization against GluN1. This response is characterized by an increase in the number of B cells in the peripheral lymphoid organs, followed by their migration

towards the meninges, passage to the ventricles and differentiation into plasma cells. The precise mechanisms responsible for B cell migration towards the brain in this model remain to be investigated. Assessing cytokine and chemokine levels may give important clues in this instance. This B-cell response is particularly relevant to the human pathology, as these cells are found in the CSF of patients (Dale *et al.*, 2013). In line with this, the nature of the inflammatory infiltrates is reminiscent of the clinical situation, in which rare T-cell infiltrates are detected (Tu'zu'n *et al.*, 2009) and CD138<sup>+</sup> cells are the main component of inflammatory infiltrates (Martinez-Hernandez *et al.*, 2011). These observations have provided the basis for the use of anti-B cell therapy using Rituximab<sup>v</sup>, a monoclonal anti-CD20 antibody (Hohlfeld, 2018). Here, the depletion of B cells prevented the depression-like symptoms and the impairments in spatial memory observed in GluN1<sup>359-378</sup> mice. This confirms the central role of the B-cell response in the establishment of encephalitis-like symptoms in these mice.

The differentiation of B cells into plasma cells coincides in the ventricles with an increase in protein concentration and the detection of anti-NMDAR IgG in the CSF. This suggests that these plasma cells are responsible for the production of anti-NMDAR autoantibodies. In fact, we detected antibodies within the brain tissue, around the ventricles and in the hippocampus, which suggests that these antibodies diffuse from the ventricles to the tissue, as is the case in previously reported models where antibodies are infused into the ventricles (Planaguma *et al.*, 2015). However, the reduction of deficits observed here in the absence of PTX injection suggests that other mechanisms are important to induce a full behavioural phenotype. PTX targets various mediators of the immune system such TLR4, chemokine receptors or regulatory T cells and induces blood–brain barrier permeation, as confirmed here. This may indicate that one or several of these PTX-mediated effects may be important for the establishment of symptoms, in addition to B-cell-mediated processes. The fact that the prevention of behaviour impairments is only partial after both B-cell depletion and PTX omission is in favour of this hypothesis, which should be tested in further studies. Finally, evaluating the respective Ig isotypes found in the CSF, brain and serum could help addressing this point further.

The model described here may provide a useful platform for further studies aimed at testing therapies for anti-NMDAR encephalitis. Given the pathophysiology described in the present work, this model may prove particularly relevant for new therapies targeting B cells. This may include B cell-directed antibodies, autoantigen specific B-cell depleting therapy or B-cell receptor signalling inhibition (Musette and Bouaziz, 2018).

## Acknowledgements

We would like to thank Antoine Fournier, Marina Rubio, Izaskun Buendia, Yannick Hommet, Laurent Lebouvier and Isabelle Bardou for their input to this work.

## Funding

I.W., P.H. and C.R. received fellowships from the Regional Council of Normandy. This work was supported by the French ANR (Agence Nationale pour la Recherche).

## Competing interests

The authors report no competing interests.

## Supplementary material

[Supplementary material](#) is available at *Brain* online.

## References

- Blome R, Bach W, Guli X, Porath K, Sellmann T, Bien CG, et al. Differentially altered NMDAR dependent and independent long-term potentiation in the CA3 subfield in a model of anti-NMDAR encephalitis. *Front Synaptic Neurosci* 2018; 10: 26.
- Carmi Y, Spitzer MH, Linde IL, Burt BM, Prestwood TR, Perlman N, et al. Allogeneic IgG combined with dendritic cell stimuli induce antitumour T-cell immunity. *Nature* 2015; 521: 99–104.
- Castillo-Gómez E, Oliveira B, Tapken D, Bertrand S, Klein-Schmidt C, Pan H, et al. All naturally occurring autoantibodies against the NMDA receptor subunit NR1 have pathogenic potential irrespective of epitope and immunoglobulin class. *Mol Psychiatry* 2017; 22: 1776–84.
- Cryan JF, Holmes A. The ascent of mouse: advances in modelling human depression and anxiety. *Nat Rev Drug Discov* 2005; 4: 775–90.
- Dale RC, Pillai S, Brilot F. Cerebrospinal fluid CD19(+) B-cell expansion in N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis. *Dev Med Child Neurol* 2013; 55: 191–3.
- Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. *Lancet Neurol* 2008; 7: 1091–8.
- DeSena AD, Greenberg BM, Graves D. 'Light switch' mental status changes and irritable insomnia are two particularly salient features of anti-NMDA receptor antibody encephalitis. *Pediatr Neurol* 2014; 51: 151–3.
- Finke C, Kopp UA, Prüss H, Dalmau J, Wandinger K-P, Ploner CJ. Cognitive deficits following anti-NMDA receptor encephalitis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 2012; 83: 195–8.
- Fournier AP, Quenault A, Martinez de Lizarrondo S, Gauberti M, Defer G, Vivien D, et al. Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. *Proc Natl Acad Sci USA* 2017; 114: 6116–21.
- Gabriel T, Macrez R, Gauberti M, Montagne A, Hebert M, Petersen K-U, et al. Immunotherapy blocking the tissue plasminogen activator-dependent activation of N-methyl-D-aspartate glutamate receptors improves hemorrhagic stroke outcome. *Neuropharmacology* 2013; 67: 267–71.
- Geis C, Planaguma J, Carreño M, Graus F, Dalmau J. Autoimmune seizures and epilepsy. *J Clin Invest* 2019; 129: 926–40.
- Gleichman AJ, Spruce LA, Dalmau J, Seeholzer SH, Lynch DR. Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. *J Neurosci* 2012; 32: 11082–94.
- Gresa-Arribas N, Titulaer MJ, Torrents A, Aguilar E, McCracken L, Leypoldt F, et al. Antibody titres at diagnosis and during follow-up of anti-NMDA receptor encephalitis: a retrospective study. *Lancet Neurol* 2014; 13: 167–77.
- Hammer C, Stepniak B, Schneider A, Papiol S, Tantra M, Begemann M, et al. Neuropsychiatric disease relevance of circulating anti-NMDA receptor autoantibodies depends on blood-brain barrier integrity. *Mol Psychiatry* 2014; 19: 1143–9.
- Hara M, Martinez-Hernandez E, Arinˆo H, Armangue T, Spatola M, Petit-Pedrol M, et al. Clinical and pathogenic significance of IgG, IgA, and IgM antibodies against the NMDA receptor. *Neurology* 2018; 90: e1386–94.
- Hogan-Cann AD, Anderson CM. Physiological roles of non-neuronal NMDA receptors. *Trends Pharmacol Sci* 2016; 37: 750–67.
- Hohlfeld R. B-cells as therapeutic targets in neuro-inflammatory diseases. *Clin Immunol* 2018; 186: 51–3.
- Irani SR, Bera K, Waters P, Zuliani L, Maxwell S, Zandi MS, et al. N-methyl-D-aspartate antibody encephalitis: temporal progression of clinical and paraclinical observations in a predominantly non-paraneoplastic disorder of both sexes. *Brain* 2010; 133: 1655–67.
- Jézequel J, Johansson EM, Dupuis JP, Rogemond V, Gréa H, Kellermayer B, et al. Dynamic disorganization of synaptic NMDA receptors triggered by autoantibodies from psychotic patients. *Nat Commun* 2017; 8: 1791.
- Jones BE, Tovar KR, Goehring A, Jalali-Yazdi F, Okada NJ, Gouaux E, et al. Autoimmune receptor encephalitis in mice induced by active immunization with conformationally-stabilized holoreceptors. *Sci Transl Med* 2019; 11: eaaw0044.
- Kraeuter A-K, Guest PC, Sarnyai Z. The Y-maze for assessment of spatial working and reference memory in mice. *Methods Mol Biol* 2019; 1916: 105–11.
- Lesept F, Chevilly A, Jezequel J, Ladepeche L, Macrez R, Aimable M, et al. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis* 2016; 7: e2466.
- Luˆttjohann A, Fabene PF, van Luijtelaar G. A revised Racine's scale for PTZ-induced seizures in rats. *Physiol Behav* 2009; 98: 579–86.
- Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, Parcq J, et al. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. *Stroke* 2011; 42: 2315–22.
- Macrez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, Van der Pol SMA, et al. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain* 2016; 139: 2406–19.
- Malviya M, Barman S, Golombek KS, Planaguma J, Mannara F, Strutz-Seebohm N, et al. NMDAR encephalitis: passive transfer from man to mouse by a recombinant antibody. *Ann Clin Transl Neurol* 2017; 4: 768–83.
- Martinez-Hernandez E, Horvath J, Shiloh-Malawsky Y, Sangha N, Martinez-Lage M, Dalmau J. Analysis of complement and plasma cells in the brain of patients with anti-NMDAR encephalitis. *Neurology* 2011; 77: 589–93.
- Michel L, Grasmuck C, Charabati M, Leˆcuyer M-A, Zandee S, Dhaeze T, et al. Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers. *Sci Transl Med* 2019; 11: eaaw0475.
- Mikasova L, De Rossi P, Bouchet D, Georges F, Rogemond V, Didelot A, et al. Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. *Brain* 2012; 135: 1606–21.
- Musette P, Bouaziz JB. Cell modulation strategies in autoimmune diseases: new concepts. *Front Immunol* 2018; 9: 622.
- Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, Mackenzie ET, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med* 2001; 7: 59–64.
- Nosadini M, Mohammad SS, Corazza F, Ruga EM, Kothur K, Perilongo G, et al. Herpes simplex virus-induced anti-N-methyl-D-aspartate receptor encephalitis: a systematic literature review with analysis of 43 cases. *Dev Med Child Neurol* 2017; 59: 796–805.

- Pan H, Oliveira B, Saher G, Dere E, Tapken D, Mitjans M, et al. Uncoupling the widespread occurrence of anti-NMDAR1 autoantibodies from neuropsychiatric disease in a novel autoimmune model. *Mol Psychiatry* 2019; 24: 1489–501.
- Planaguma J, Leypoldt F, Mannara F, Gutiérrez-Cuesta J, Martín-García E, Aguilar E, et al. Human N-methyl D-aspartate receptor antibodies alter memory and behaviour in mice. *Brain* 2015; 138: 94–109.
- Schmued LC, Stowers CC, Scallet AC, Xu L. Fluoro-Jade C results in ultra high resolution and contrast labeling of degenerating neurons. *Brain Res* 2005; 1035: 24–31.
- Slattery DA, Cryan JF. Using the rat forced swim test to assess anti-depressant-like activity in rodents. *Nat Protoc* 2012; 7: 1009–14.
- Taraschenko O, Fox HS, Pittock SJ, Zekeridou A, Gafurova M, Eldridge E, et al. A mouse model of seizures in anti-N-methyl-d-aspartate receptor encephalitis. *Epilepsia* 2019; 60: 452–63.
- Turner VM, Mabbott NA. Ageing adversely affects the migration and function of marginal zone B cells. *Immunology* 2017; 151: 349–62.
- Tu'zi'n E, Zhou L, Baehring JM, Bannykh S, Rosenfeld MR, Dalmau J. Evidence for antibody-mediated pathogenesis in anti-NMDAR encephalitis associated with ovarian teratoma. *Acta Neuropathol* 2009; 118: 737–43.
- Vincent A, Bien CG. Anti-NMDA-receptor encephalitis: a cause of psychiatric, seizure, and movement disorders in young adults. *Lancet Neurol* 2008; 7: 1074–5.
- Whittaker Hawkins RF, Patenaude A, Dumas A, Jain R, Tesfagiorgis Y, Kerfoot S, et al. ICAM1 + neutrophils promote chronic inflammation via ASPRV1 in B cell-dependent autoimmune encephalomyelitis. *JCI Insight* 2017; 2: e96882.
- Wright S, Hashemi K, Stasiak L, Bartram J, Lang B, Vincent A, et al. Epileptogenic effects of NMDAR antibodies in a passive transfer mouse model. *Brain* 2015; 138: 3159–67.




## RESEARCH

## Open Access



# Tissue plasminogen activator worsens experimental autoimmune encephalomyelitis by complementary actions on lymphoid and myeloid cell responses

Pauline Hélie<sup>1,2†</sup>, Celia Camacho-Toledano<sup>3†</sup>, Léonie Leseq<sup>1</sup>, Célia Seillier<sup>1</sup>, Antonio J. Miralles<sup>3</sup>, Maria Cristina Ortega<sup>3</sup>, Sylvaine Guérit<sup>1</sup>, Héloïse Lebas<sup>1</sup>, Isabelle Bardou<sup>1</sup>, Virginia Vila-del Sol<sup>4</sup>, Denis Vivien<sup>1,5</sup>, Brigitte Le Mauff<sup>1,6</sup>, Diego Clemente<sup>3†</sup>, Fabian Docagne<sup>1\*†</sup>  and Olivier Toutrais<sup>1,6†</sup>

## Abstract

**Background:** Tissue plasminogen activator (tPA) is a serine protease involved in fibrinolysis. It is released by endothelial cells, but also expressed by neurons and glial cells in the central nervous system (CNS). Interestingly, this enzyme also contributes to pathological processes in the CNS such as neuroinflammation by activating microglia and increasing blood–brain barrier permeability. Nevertheless, its role in the control of adaptive and innate immune response remains poorly understood.

**Methods:** tPA effects on myeloid and lymphoid cell response were studied *in vivo* in the mouse model of multiple sclerosis experimental autoimmune encephalomyelitis and *in vitro* in splenocytes.

**Results:** tPA<sup>-/-</sup> animals exhibited less severe experimental autoimmune encephalomyelitis than their wild-type counterparts. This was accompanied by a reduction in both lymphoid and myeloid cell populations in the spinal cord parenchyma. In parallel, tPA increased T cell activation and proliferation, as well as cytokine production by a protease-dependent mechanism and *via* plasmin generation. In addition, tPA directly raised the expression of MHC-II and the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 at the surface of dendritic cells and macrophages by a direct action dependent of the activation of epidermal growth factor receptor.

(Continued on next page)

\* Correspondence: [docagne@cyceron.fr](mailto:docagne@cyceron.fr)

<sup>†</sup>Pauline Hélie, Celia Camacho-Toledano, Diego Clemente, Fabian Docagne and Olivier Toutrais contributed equally to this work.

<sup>1</sup>UNCAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PHIND), Normandie Univ, Caen, France

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 Open Access This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.

(Continued from previous page)

**Conclusions:** Our study provides new insights into the mechanisms responsible for the harmful functions of tPA in multiple sclerosis and its animal models: tPA promotes the proliferation and activation of both lymphoid and myeloid populations by distinct, though complementary, mechanisms.

**Keywords:** Tissue plasminogen activator, Neuroinflammation, Experimental autoimmune encephalomyelitis, T cell response, Antigen-presenting cells

## Background

Multiple sclerosis (MS) is a chronic disease of the central nervous system (CNS) characterized by lymphoid and myeloid cell infiltration and microglial activation, leading to demyelination and progressive neurodegeneration [1]. Tissue plasminogen activator (tPA), a serine protease involved in fibrinolysis [2], is mainly produced by endothelial cells of vessels [3], whereas this protease is also secreted by several cell types within the CNS such as oligodendrocytes [4], astrocytes [5], or neurons [5, 6]. tPA influences neuroinflammatory and neuroimmune processes [7]. Indeed, its effects are particularly relevant to the context of MS: tPA activity is increased by tenfold in the cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients [8], and the protease is found in the perivascular spaces associated to active MS plaques [9].

Myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)<sub>35-55</sub>-induced experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a well-established animal model of MS, is characterized by the recruitment and entry of CD4<sup>+</sup> encephalitogenic T cells into the CNS parenchyma [10]. Interestingly, pioneer studies reported that tPA activity is increased in EAE [11, 12] and that tPA-deficient mice (tPA<sup>-/-</sup>) declare EAE later than their wild-type (WT) counterparts, with less severe symptoms in the early phase of the disease, reduced demyelination, axonal damage, microglial activation, and T cell presence in the parenchyma [11]. Later studies in slightly different experimental designs drew opposite conclusions, showing earlier and more severe disease in tPA<sup>-/-</sup> mice [13]. This indicates that tPA can provide different effects in the EAE course, depending on the phase of the disease and the experimental design.

Several actions of tPA can participate in its controversial effects in EAE. In addition to its protease activity, tPA exerts various functions due to its five distinct functional domains: finger domain, epidermal growth factor (EGF)-like domain, kringle 1, kringle 2, and protease domain [14]. We have previously shown that tPA, by activating the EGF receptor (EGFR), has an anti-apoptotic effect over oligodendrocytes [4] and a chemotactic effect on their progenitors that helps remyelination after chemically induced white matter lesions [15]. tPA is also able to increase blood–brain barrier (BBB) permeability and helps leukocyte diapedesis [16] by several

mechanisms, including the potentiation of endothelial N-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR) [17] or tight junction disruption by the modification of occludin phosphorylation [18]. Our group has shown that Glunomab®, a monoclonal antibody which prevents the binding of tPA on the GluN1 subunit of NMDAR [19], inhibits leukocyte entry into the CNS, thus blocking demyelination and EAE progression [17].

In addition to these actions, controversial data indicate that tPA may directly act on cells of the innate immunity. tPA can regulate myeloid cell functions, but the pro- or anti-inflammatory nature of this action is still a matter of debate [20, 21]. On the other hand, the possible role of tPA on lymphoid cell activity is still poorly understood [7]. Therefore, the purpose of this study is to investigate the respective actions of tPA on lymphoid and myeloid cells in the context of EAE. Interestingly, we report a deleterious role of tPA in EAE, that may be due to an increase in T cell proliferation, combined to a direct potentiation of dendritic and macrophage antigen presenting function. These combined effects of tPA converge to the promotion of pro-inflammatory T cell adaptive immune response in EAE.

## Methods

### Animals

Transgenic tPA<sup>-/-</sup> (C57BL/129 background) [22] and C57BL/129 control mice, aged 8–12 weeks, were provided by the *Centre Universitaire de Ressources Biologiques* (CURB, University of Caen, France). C57BL6/J mice aged 6–12 weeks were obtained from Janvier Laboratories. Mice were housed in our local conventional animal facilities. All procedures were performed according to the guidelines of the institutional ethics committee (*Comité Normand d'éthique en matière d'expérimentation animale* (CeNomExa) and *Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Nacional de Paraplégicos*). This was submitted to these committees for approval in accordance with the European directive no. 2013/63/UE (agreement number D14118001) and with the French and Spanish National and Regional Guidelines for Animal Experimentation and the Use of Genetically Modified Organisms (French Ministry of Research, project license number 02653.2, Decree 87/848;

RD 53/2013 and 178/2004, Law 32/2007 and 9/2003, Decree 320/2010).

#### Reagents

Recombinant human tPA (Actilyse®) was purchased from Boehringer Ingelheim (Ingelheim am Rhein, Germany). Several controls of tPA and other reagents were used along the study: dialyzed tPA, tPA GGACK, or corresponding vehicles (DMSO, Sigma-Aldrich). tPA dialysis was performed for 48 h at 4 °C against 0.3 M HEPES to remove the arginine vehicle. tPA GGACK was obtained by incubating GGACK (1,5-dansyl-L-glutamyl-L-glycyl-L-arginine chloromethylketone, EMD) with Actilyse in a fourfold molar excess for 6 h at room temperature (RT), followed by dialysis for 48 h at 4 °C with 0.3 M HEPES to remove unbound GGACK and the arginine vehicle. The loss of proteolytic activity of tPA GGACK was confirmed with spectrozyme assay (American Diagnostica) [4]. Aprotinin and epsilon-aminocaproic acid ( $\epsilon$ -ACA) were purchased from Sigma-Aldrich. AG1478 hydrochloride was purchased from Tocris. Antibodies used in this study are listed in Suppl. Table 1.

#### EAE induction

Monophasic EAE was induced in 6–12-week-old C57BL/6J female and C57BL/129 tPA<sup>-/-</sup> male mice by active immunization with MOG<sub>35-55</sub> peptide (Cambridge Research Biochemicals, Genscript). To this end, mice were injected subcutaneously with 200  $\mu$ g of Complete Freund's adjuvant (Sigma-Aldrich) containing 400  $\mu$ g of inactivated particles of *Mycobacterium tuberculosis* (BD Biosciences). The emulsion was administered to regions above the shoulders and the flanks into four sites (50  $\mu$ L at each injection site). All animals were intraperitoneally injected at days 0 and 2 with 250 ng of pertussis toxin (Sigma-Aldrich) in 200  $\mu$ L of saline. Mice were weighted and scored daily in a double blind manner for clinical signs of EAE as follows: 0, no disease; 1, limp tail; 2, hindlimb weakness/ no hindlimb reflex; 3, hindlimb paresis; 4, hindlimb paralysis; 5, moribund or dead. In accordance with the ethical standards and regulations, the humane endpoint criteria were applied when an animal reached a clinical score of  $\geq 4$  for more than 48 h or presented signs of stress or pain (generation of sounds, stereotypic behavior, lordokyphosis, hair loss, or loss of weight superior to 2 g/day for more than 48 h).

#### Isolation of leukocytes from spleens and spinal cords

Mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane (Aer-rane, Baxter) and transcardially perfused with 50 mL of cold phosphate-buffered saline, pH 7.4 (PBS, Sigma-Aldrich). Spinal cords were harvested at the EAE plateau phase [day post-immunization (dpi) 20  $\pm$  3] and

homogenized in PBS. Leukocytes were recovered at the 30:70% Percoll (Fisher Scientific) interface after gradient centrifugation as described in the literature [23] and were then counted with the Malassez chamber. Spleens were aseptically removed from naïve and MOG-immunized C57BL/6 mice at the peak of clinical score ( $\geq 3$ , dpi 15–18), as described previously [24], mechanically processed to obtain a splenocyte suspension by passing the cells through a 40- $\mu$ m filter (Falcon). Erythrocytes were lysed in lysis buffer [0.15 M NH<sub>4</sub>Cl, 9 mM HKCO<sub>3</sub>, 0.5 M EDTA, pH 7.4 (Stemcell Technologies)], and the sterile splenocytes were resuspended in supplemented sterile PBS with 10% filtered and inactivated fetal bovine serum (FBS, Stemcell Technologies), 1% Penicillin/Streptomycin (Gibco), and 2.5% (v/v) HEPES (Fisher).

#### Analysis of the effect of tPA on myeloid cell functions

Splenocytes (10<sup>6</sup> per well in 24 well plates) were cultured and maintained in RPMI (Gibco) supplemented with 10% FBS (Linus), 1% Penicillin/Streptomycin, 2.5% (v/v) HEPES, 2 mM L-glutamine (Gibco), and 50  $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol in the presence of the following molecules for 24 h: tPA (0.2, 2, and 20  $\mu$ g/mL) or its vehicle [34.84 mg/mL arginine (Sigma-Aldrich), 10.72 mg/mL phosphoric acid (Sigma-Aldrich) and 0.1 mg/mL Tween 80 (Sigma-Aldrich)], Glunomab® antibody (10  $\mu$ g/mL) or its isotypic control [17], 2  $\mu$ g/mL tPA-GGACK (with blocked serine protease activity), 5  $\mu$ M of the EGFR inhibitor (AG1478 hydrochloride, additional 30-min preincubation).

#### Analysis of the effect of tPA on lymphoid cell proliferation

Naive splenocytes (1.5  $\times$  10<sup>6</sup>/mL in suspension) were incubated for 20 min at RT in PBS with 0.5  $\mu$ M CFSE (Life technologies). Cells were then washed and suspended in complete DMEM containing: 1% penicillin–streptomycin (P/S, Sigma-Aldrich), 1% GlutaMax-I 100X (Gibco), 10% FBS, and 0.1%  $\beta$ -mercaptoethanol. Ninety six-well U-bottom plates were coated with 1  $\mu$ g/mL anti-mouse CD3 antibody (eBioscience) in PBS overnight. The plates were washed twice with 200  $\mu$ L of PBS and 10<sup>5</sup> labelled splenocytes were plated (P96 well) in 200  $\mu$ L of complete DMEM and incubated for 96 h with 1  $\mu$ g/mL anti-mouse CD28 antibody (eBioscience) in the presence or not of tPA at different concentrations (0.1, 1, and 10  $\mu$ g/ml [4], 10  $\mu$ g/ml Glunomab® antibody or its isotypic control [17],  $\epsilon$ -ACA, an inhibitor of the protease function of tPA (200 mM), the plasmin inhibitor aprotinin (20 IU/mL<sup>-1</sup>) [25], or tPA-GGACK (10  $\mu$ g/mL). Then, cells were harvested by centrifugation (2000 rpm, 10 min, RT), washed in PBS and stained for the flow cytometry assay. To study the effect of tPA during MOG-induced



stimulation, splenocytes were obtained from MOG-immunized C57BL/6/J mice at the peak of clinical score ( $\geq 3$ ), as described previously [24, 26] and were plated in IMDM (BioWest, Nuaille, France), supplemented with 2-mM L-glutamine, 1% P/S, 10% FBS (Gibco), and 50- $\mu$ M  $\beta$ -mercaptoethanol, in U-bottom 96-well plates at a density of  $2 \times 10^5$  cells. Splenocytes were exposed to 2- $\mu$ M Tag-it Violet™ Proliferation and Cell Tracking Dye (Biolegend) diluted in PBS supplemented with 0.1% BSA at 37 °C with shaking for 20 min, protected from light. After washing, splenocytes were stimulated for 72 h with 5  $\mu$ g/mL MOG and treated with 2  $\mu$ g/mL tPA, 5  $\mu$ M AG1478 or the combination of both. Cells were harvested by centrifugation at 2000 rpm at RT, washed in PBS and stained for the flow cytometry assay.

In order to analyze the direct effect of tPA on MHC-II upregulation and on T cell proliferation, splenocytes from EAE mice at the peak of their clinical symptoms were depleted of CD3 T cells by cell sorting in a FACS Aria Iiu. These splenocytes were plated at  $2 \times 10^5$  cells per well in U-bottom 96-well plates with and were exposed to MOG or MOG + tPA. After 24 h, the medium was replenished in all culture conditions, and  $5 \times 10^4$  sorted Tag-it Violet-labelled CD3<sup>+</sup> T cells from other EAE mice at the peak of their clinical symptoms were added to each well. In one of the culture conditions, tPA was removed to check the direct effect of the protease on antigen presentation capacity. After 72 h, cells were harvested, and CD3, CD4, and CD8 proliferative cells were counted in a FACS Canto II cytometer.

The proliferation index has been calculated dividing the sum of the cells in all generations by the computed number of original parent cells, which were theoretically present at the beginning of the experiment. Analysis of data was performed using the ModFit LT™ software (Verity Software House).

#### Flow cytometry

Cells were resuspended in 50  $\mu$ l of staining buffer, and Fc receptors were blocked for 15 min at 4 °C with 10  $\mu$ g/mL anti-CD16/CD32 antibodies (BD Biosciences.) After the blocking step, cells were labelled for 20 min at 4 °C with corresponding fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (Suppl. Table 1). The BD Pharmingen transcription factor buffer set was used according to the manufacturer's protocol to detect expression of FoxP3. When necessary, cells were fixed in a final volume of 300  $\mu$ l with 4% paraformaldehyde (PFA) for 10 min. For detection of intracellular cytokines, splenocytes were stimulated for 5 h with 500 ng/mL PMA (Sigma-Aldrich) and 500 ng/mL ionomycin (Sigma-Aldrich) in the presence of 10  $\mu$ g/ml brefeldin A (Biolegend). Then, cells were fixed and permeabilized with cyto Fix/Perm (Biolegend) and stained at RT for 30 min. Samples were

acquired on a FACS Verse or a FACS Canto II cytometer (Beckton Dickinson), and data were analyzed with the FlowJo 7.6.5 software (TreeStar Inc.). Cell frequencies were determined by flow cytometry and absolute numbers calculated from counts determined using a hemocytometer (Malassez chamber).

#### Cytokine assay

Levels of cytokines in supernatants of anti-CD3/CD28 stimulated splenocytes were determined using the cytometric bead array (CBA) mouse Th1/Th2/Th17 cytokine kit (BD Biosciences) according to the manufacturer's protocol. Measurements were performed using FACS Verse flow cytometer, and data were analysed with the FCAP Array™ software (version 3.0).

#### Immunofluorescence

Mice at the EAE plateau phase (d20  $\pm$  3) and with matching mean scores were deeply anesthetized and transcardially perfused with 50 mL of cold 1X PBS. Tissue samples were postfixed for 24 h at 4 °C with 4% PFA and then cryoprotected for 24 h at 4 °C with 20% sucrose solution, before freezing process into Tissue-Tek (Miles Scientific). Samples were then cut with a cryomicrotome (Leica) to obtain 10- $\mu$ m sections which were thaw-mounted on polylysine-coated slides and stored at -80 °C before experiment. After warming, sections were rehydrated three times in PBS during 15 min and incubated overnight at RT with the following antibodies: rabbit anti-CD3 (1:200, Abcam ab5690), rat anti-CD4 (1:25, eBiosciences 14-0042-82, clone RM4-5), and goat anti-colIV (1:1000, Southern Biotech 1340). Primary antibodies were revealed by using affinipure F(ab')<sub>2</sub> fragments of donkey IgGs conjugated to Alexa 647, Alexa 488 or Cy3 (1:1000, Jackson Immuno Research). Then, sections were washed in PBS and coverslipped with anti-fading medium containing DAPI. Images were digitally captured on Leica DM6000 microscope-coupled cool-snap camera, visualized with Metavue 5.0 software (Molecular Devices, USA) and further processed using ImageJ 1.49e software (NIH). For cell counting, images of three WT and three tPA<sup>-/-</sup> hemi-spinal cord sections from cervical, upper thoracic, lower thoracic, and lumbar/sacral regions were analyzed with the Fiji (ImageJ) software: an image-by-image threshold was applied to obtain a binary image for automatic particle counting (cells/mm<sup>2</sup>) using a minimal particle size assigned to overcome the background noise of the image.

#### Statistical analysis

Results are presented as the mean + SEM and were analysed with the GraphPad Prism and SigmaPlot 11.0 softwares. Normality tests were performed on all samples (Agostino-Pearson omnibus and Shapiro-Wilk tests).

Nonparametric Kruskal–Wallis for multiple comparisons were used, followed by two-by-two comparisons by Mann–Whitney’s U tests when relevant. For multiple comparisons, an ANOVA test or its corresponding ANOVA on RANKS was performed followed by the Tukey or Dunn post hoc tests (compared with the control condition or all pairwise), respectively. The minimum value of statistical significance considered was  $P < 0.05$ ; for comparison of incidence curves, log-rank (Mantel-cox test) was used.

## Results

### EAE is less severe in tPA-deficient mice

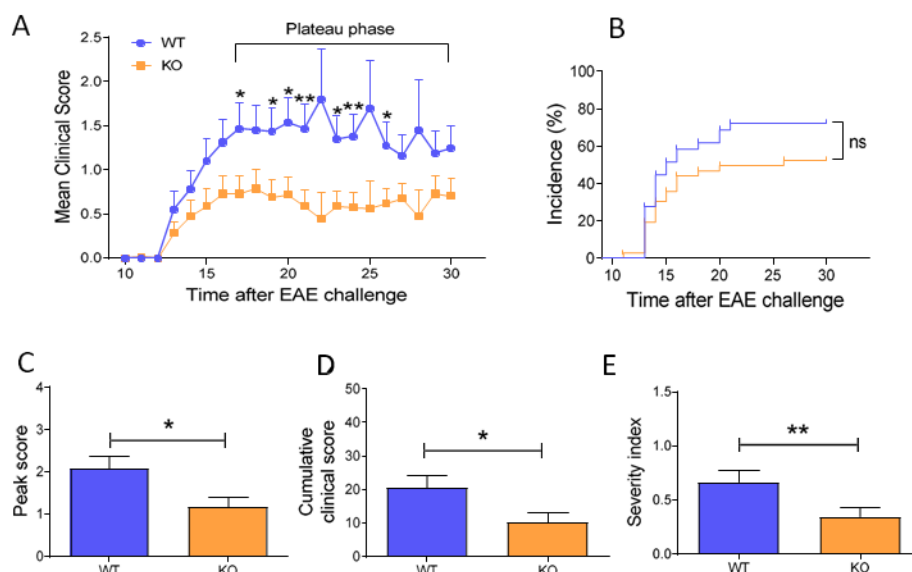
tPA<sup>-/-</sup> mice developed less severe EAE disease than their WT counterparts (control group), with lower clinical scores during the plateau phase between dpi 17 and 23 (d20 ± 3) (Fig. 1a). Although no significant difference was observed between tPA<sup>-/-</sup> and WT mice in the incidence of the disease ( $P = 0.1194$ , Fig. 1b) nor for the day of disease onset (tPA<sup>-/-</sup> 15.13 ± 0.88 vs WT 14.6 ± 0.45,  $P = 0.8159$ , data not shown), peak score and cumulative clinical score were significantly lower in tPA<sup>-/-</sup> than in WT mice (tPA<sup>-/-</sup> peak score 1.16 ± 0.23 vs WT 2.07 ± 0.29,  $P = 0.0164$ ; cumulative clinical score 10.17 ± 2.89 vs 20.38 ± 3.76,  $P = 0.0163$ , Fig. 1c and d). In addition, severity index ([26]), was significantly lower in tPA<sup>-/-</sup> than in WT mice (tPA<sup>-/-</sup> severity index 0.3440 ± 0.08 vs WT 0.6652 ± 0.10,  $P = 0.0075$ , Fig. 1e).

### tPA enhances T cell response by a proteolytic mechanism

Given that immune cell infiltration is a cardinal feature of EAE, we analyzed T cell subpopulations in the spinal

cords of EAE mice during the plateau phase of the disease (d20 ± 3) by flow cytometry (Fig. 2 and Suppl. Fig. 1) and immunofluorescence (Suppl. Fig. 2). We found that the absolute number of CD4<sup>+</sup> T cells was lower in tPA<sup>-/-</sup> than in WT mice (6940 ± 1220 vs 27,110 ± 3642 cells;  $P = 0.0238$ , Suppl. Fig. 1B, Fig. 2a), an observation consistent with the clinical scores observed in tPA<sup>-/-</sup> EAE mice (Fig. 1). Neither CD8<sup>+</sup> (WT 61,291 ± 11,070 cells vs tPA<sup>-/-</sup> 42,721 ± 4988 cells,  $P = 0.5476$ , Fig. 2b) nor regulatory FoxP3<sup>+</sup> T cell (T<sub>reg</sub>) (WT 2396 ± 2322 cells vs tPA<sup>-/-</sup> 394.6 ± 444 cells;  $P = 0.1667$ , Fig. 2c) were significantly altered. In accordance with the above data, CD4<sup>+</sup> T cells were the only CD3<sup>+</sup> T cell subset that showed changes in the spinal cord of tPA<sup>-/-</sup> mice (tPA<sup>-/-</sup> 13.87% ± 2.44 vs WT 29.85% ± 4.01,  $P = 0.0476$ , Fig. 2d). Concordantly, the histological analysis of the spinal cords (Fig. 2e) further showed that the average density of CD4<sup>+</sup> T cells within infiltrated area was lower in tPA<sup>-/-</sup> than in WT EAE mice (absolute number of WT 514.4 ± 135.7 vs tPA<sup>-/-</sup> 245.3 ± 50.78,  $P = 0.0495$ , Fig. 2g and Suppl. Fig. 2A–C) and that these changes were mainly due to differences in the cervical region (WT 51.33 ± 13.49 vs tPA<sup>-/-</sup> 9.97 ± 1.98,  $P = 0.0495$ , Fig. 2h). Interestingly, when analyzing the cytokine profile of CD4<sup>+</sup> T cells *in vivo*, we showed that the percentage of IFN- $\gamma$ /CD4<sup>+</sup> T cells—but not IL-17/CD4<sup>+</sup> T cells—was significantly decreased in tPA<sup>-/-</sup> EAE mice as compared with WT EAE (IFN- $\gamma$ /CD4<sup>+</sup> T cells WT 9.4% ± 4 vs. tPA<sup>-/-</sup> 2.8% ± 0.8,  $P = 0.011$ ; IL-17/CD4<sup>+</sup> T cells WT 4% ± 2.3 vs. tPA<sup>-/-</sup> 2% ± 0.6,  $P = 0.3$ ; Fig. 2i and j, Suppl. Fig. 1C).

To determine the mechanisms involved in the decrease of CD4<sup>+</sup> T cell number in tPA<sup>-/-</sup> EAE mice, we assessed their functional response *in vitro* after



**Fig. 1** tPA<sup>-/-</sup> mice show less EAE symptoms than WT mice. **a** Mean EAE clinical score, **b** incidence, **c** peak score, **d** cumulative clinical score, and **e** severity index for WT and tPA<sup>-/-</sup> mice. Results are expressed as mean + SEM.  $N = 29$  (WT) and  $N = 35$  (tPA<sup>-/-</sup>). \* $P < 0.05$  and \*\* $P < 0.01$

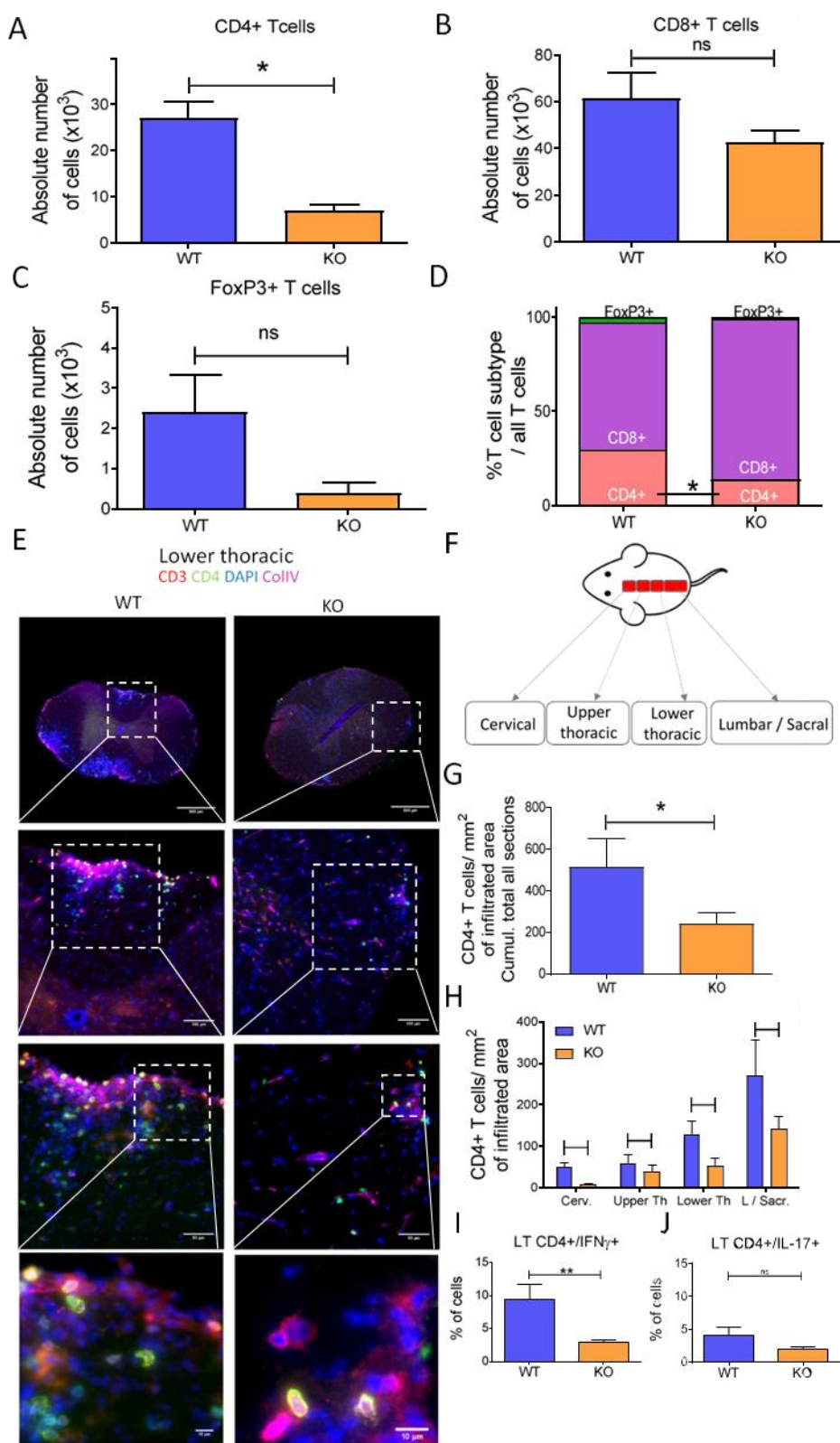


Fig. 2 (See legend on next page.)



(See figure on previous page.)

Fig. 2 tPA<sup>-/-</sup> mice show reduced CD4<sup>+</sup> T cell infiltration than WT in the spinal cord. Absolute number of infiltrated a CD4<sup>+</sup>, b CD8<sup>+</sup>, and c FoxP3<sup>+</sup> T cells in spinal cords of WT and tPA<sup>-/-</sup> EAE mice measured by Maxiscreen cell counting and flow cytometry. Results are expressed as mean ± SEM. *N* = 6 (WT) and *N* = 3 (tPA<sup>-/-</sup>). \**P* < 0.05. d Percentages of T cell subtypes relative to total CD3<sup>+</sup> T cell number in the spinal cord of tPA<sup>-/-</sup> and WT EAE mice. e Photomicrographs show representative immunofluorescence staining (from *N* = 3 for tPA<sup>-/-</sup> and WT) for CD3, CD4, and COLV markers in the lower thoracic region of mice spinal cords. Nuclei were counterstained with DAPI (blue). f Scheme describing the different parts of the spinal cord. g and h Quantification of the average density of CD4<sup>+</sup> T cells within infiltrated areas in g the whole spinal cord and in h individual segments (Cerv. cervical, Upper Th. upper thoracic, Lower Th. lower thoracic, LSacr. lumbar/sacral. (*N* = 3). \**P* < 0.05. i and j Intracytoplasmic cytokine detection by flow cytometry in splenocytes from tPA<sup>-/-</sup> and WT EAE mice (10 days post-immunization) after stimulation with PMA/ ionomycin. Graphs show the percentage of CD4<sup>+</sup>/IFN-γ<sup>+</sup> T cells and CD4<sup>+</sup>/IL-17<sup>+</sup> T cells. *N* = 7 (WT) and *N* = 7 (tPA<sup>-/-</sup>). \**P* < 0.01

activation with anti-CD3ε/CD28. CD4<sup>+</sup> T cells from tPA<sup>-/-</sup> naive mice proliferated less than CD4<sup>+</sup> T cells from their WT counterparts (proliferation index: tPA<sup>-/-</sup> 2.03 ± 0.43 vs WT 6.18 ± 1.38; *P* = 0.0317; Fig. 3a and b). Activation level measured by mean fluorescence intensity (MFI) of CD25 was also reduced in CD4<sup>+</sup> T cells from tPA<sup>-/-</sup> as compared with WT CD4<sup>+</sup> T cells (51.42% ± 10.96 of WT; *P* = 0.0286, Fig. 3d). Importantly, the addition of exogenous tPA rescued the proliferation and activation of tPA<sup>-/-</sup> CD4<sup>+</sup> T cells at the same level as CD4<sup>+</sup> T cells from WT counterparts (*P* = 0.8413 and *P* = 0.3143, respectively; Fig. 3a, b, and d). As in the case of the *in vivo* analysis, CD8<sup>+</sup> T cell proliferation was not affected in tPA<sup>-/-</sup> (proliferation index 11.65 ± 4.93 vs tPA<sup>-/-</sup> 6.57 ± 3.35, *P* = 0.3095) although their activation was reduced (59.34% ± 14.48 of WT, *P* = 0.0286; Fig. 3a, c and e).

We next examined the effect of tPA on T cell response *in vitro*. tPA significantly increased proliferation and activation of anti-CD3ε/CD28 activated CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in a dose-dependent manner, in comparison with the control group of untreated cells (Fig. 4a-e). At the dose of 10 μg/mL of tPA, proliferation of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells were increased to reach 163.40% ± 11.28 (*P* = 0.0004) and 170.90% ± 12.59 (*P* = 0.0012), respectively. No effect of tPA was observed on T<sub>reg</sub> cells (*P* = 0.9999, Fig. 4f). In order to further analyze the profile of CD4<sup>+</sup> T cells involved in the response to tPA treatment, we analyzed by flow cytometry the expression of CCR6 and CXCR3, two chemokine receptors involved in the CNS trafficking of Th17 and Th1 cells, respectively. We observed an increase in the percentage of CCR6<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells, with no changes in the percentage of CXCR3<sup>+</sup>/CD4<sup>+</sup> T cells after treatment of splenocytes with tPA (10 μg/mL) for 72 h (Fig. 4g).

Next, we investigated the mechanisms underlying tPA actions on T cells. Since the primary action of tPA is to activate plasminogen into plasmin, we interrogated the different elements of the tPA/plasminogen/plasmin cascade. Plasminogen treatment neither increased CD4<sup>+</sup> T cell proliferation nor potentiated the proliferative action of tPA on CD4<sup>+</sup> T cells (*P* = 0.400 and *P* = 0.200; Fig. 4h). However, aprotinin, a specific inhibitor of plasmin, did reverse tPA-mediated activation (for CD4<sup>+</sup> T cells, *P*

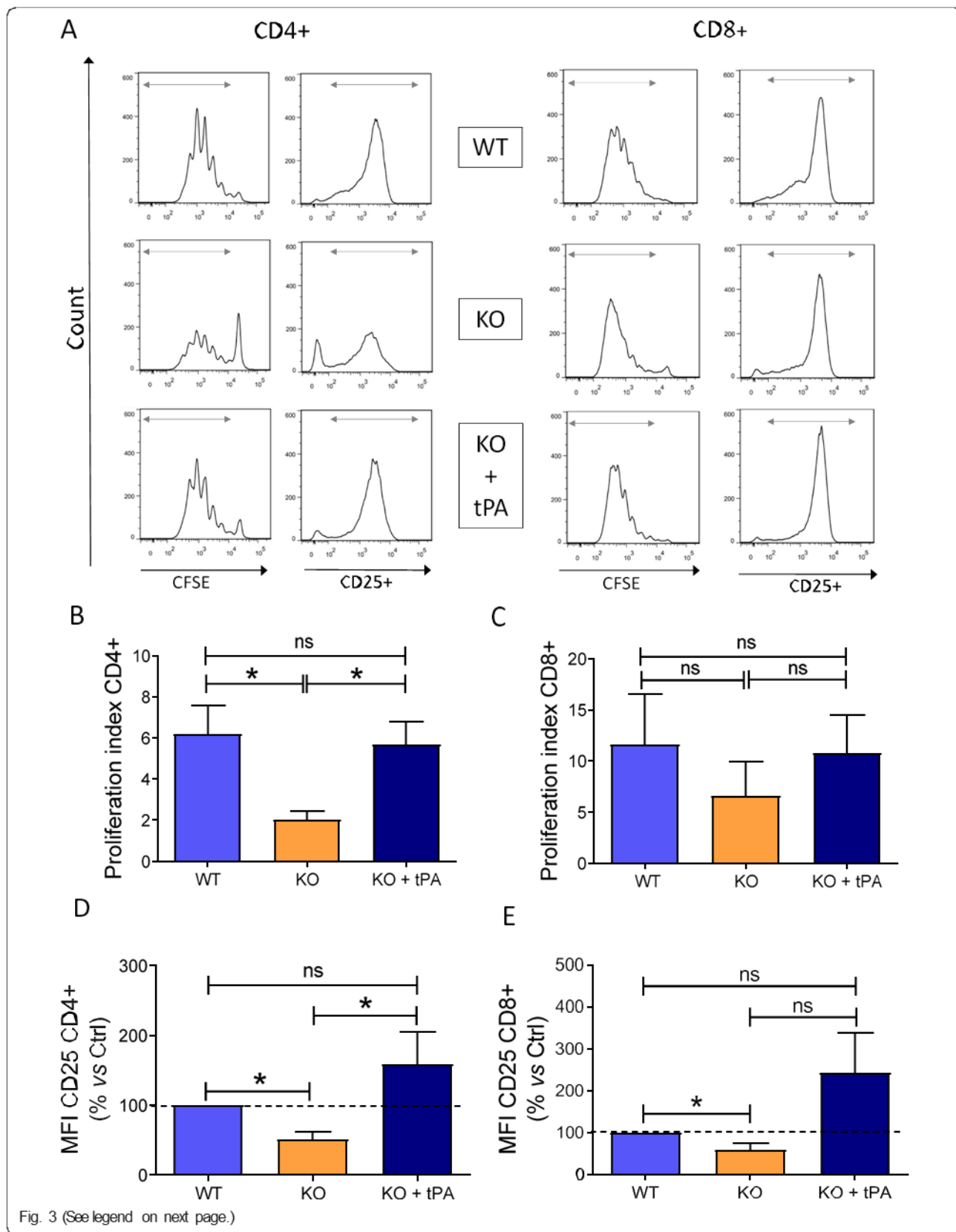
= 0.0190; for CD8<sup>+</sup>, *P* = 0.0109; Fig. 4i and j). In addition, the inactivation of the catalytic activity of tPA (tPA-GGACK) abolished tPA stimulatory effect on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell proliferation (*P* = 0.0252 and 0.0162, respectively; Fig. 4i and j). In addition, ε-ACA, an inhibitor of plasmin generation from plasminogen inhibited the stimulatory effect of tPA on CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cell proliferation (*P* = 0.0056 and *P* = 0.0040, respectively; Fig. 4i and j). This indicates that tPA increases T cell proliferation *via* the proteolytic activation of plasminogen into plasmin.

We next explored if tPA-mediated effects on T cell proliferation was related to its previously demonstrated proteolytic action on NMDAR [27], as this receptor was previously reported to be expressed on T cells [28, 29]. Glunomab®, a monoclonal antibody that blocks the interaction between tPA and NMDAR [19], did not alter the proliferative effect of tPA on CD4<sup>+</sup> T cells (Supplementary Fig. 3). This result excluded that tPA may act on T cell proliferation by acting on NMDAR.

Furthermore, since cytokines are key mediators of T cell-driven autoimmunity, we analyzed the impact of tPA on the late cytokine pattern of activated T cells. tPA-induced an increase of IL-6 and IL-10 secretion by activated splenocytes at 4 days of culture (respectively 233.9% ± 47.45, *P* = 0.0289 and 499.4% ± 184.3, *P* = 0.0029, Fig. 4k). In addition, concerning IL-6, this effect was not observed with tPA-GGACK and was inhibited in the presence of ε-ACA or aprotinin (*P* = 0.0167, 0.0167, and 0.0333, respectively, Fig. 4l). ε-ACA also reverted the activation of IL-10 secretion by tPA (*P* = 0.0167, Fig. 4m). Together, these data indicate that tPA increases T cell proliferation *via* the generation of plasmin to increase their proliferation, activation, and secretion of cytokines.

#### tPA enhances myeloid cell maturation by the activation of EGFR

Our next step was to analyze whether the distribution of myeloid cells is altered in the spinal cord of tPA<sup>-/-</sup> EAE mice. We found that absolute numbers of CD11c<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> (dendritic cells, DCs) and CD45<sup>high</sup>/CD11c<sup>-</sup>/CD11b<sup>high</sup> (activated microglia and infiltrated macrophages, M) were lower in the spinal cords of tPA<sup>-/-</sup>



(See figure on previous page.)

Fig. 3 Endogenous tPA stimulates CD4<sup>+</sup>T cell proliferation and activation. tPA<sup>-/-</sup> and WT splenocytes were activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (both 1 µg/mL) and treated in the indicated conditions for 4 days. a Representative flow cytometry histograms for proliferation (CFSE) and activation (CD25<sup>+</sup>) of T cells. Corresponding quantification of proliferation index for b CD4<sup>+</sup> and c CD8<sup>+</sup> T cells. Percentage of increase of CD25 for d CD4<sup>+</sup> and e CD8<sup>+</sup> T cells. Results are expressed as mean + SEM (N = 5). \*P < 0.05

EAE mice as compared with their WT EAE counterparts (DCs 15,474 ± 2984 vs 72,283 ± 8330; *P* = 0.0238; microglia/M : 14,980 ± 5442 vs 119,228 ± 16,810, *P* = 0.0238; Suppl. Fig. 4, Fig. 5a and b).

We then analyzed whether tPA may affect the proportion and the phenotype of DCs and M (Fig. 6, Suppl. Fig. 5). First, splenocytes extracted from EAE mice at the peak of the clinical course were treated with different concentrations of exogenous tPA (0.2, 2, and 20 µg/mL) during 24 h. None of the tPA concentrations modified the percentage of antigen presenting DCs (CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>) and M (F4/80<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>) populations (Fig. 6a and b). However, tPA (2 µg/mL) induced a significant increase of MHC-II<sup>+</sup> MFI in both cell populations compared to control conditions (DCs 120.75% ± 3.92; M 121.69% ± 4.72, *P* < 0.001, Fig. 6c and d). Splenic APCs modify their immunophenotype along the clinical course of EAE. The number of APCs with a more immunogenic profile (i.e., MHC-II<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> CD40<sup>+</sup> cells) increased along the clinical course of the disease, being maximum at the peak. In parallel, the number of APCs with a more tolerogenic immunophenotype (i.e., MHC-II<sup>+</sup> CD80<sup>-</sup> CD86<sup>-</sup> PD-L1<sup>+</sup> cells) decreased, being minimum at the peak and remained very high in asymptomatic EAE mice (suppl. Fig. 6). Interestingly, tPA (2 µg/mL) promoted the polarization on the MHC-II<sup>+</sup> expressing antigen-presenting cell (APC) subsets towards a more pro-inflammatory and immunogenic phenotype, with a significant increase in the percentage of MHC-II<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup>-APCs (DCs 122.45 ± 6.22, *P* = 0.002; M 128.04 ± 5.70; *P* = 0.004, Fig. 6e and f) and a decrease in the percentage of MHC-II<sup>+</sup> CD80<sup>-</sup> CD86<sup>-</sup> tolerogenic APCs (DCs 87.09% ± 3.20, M 86.71% ± 2.70; *P* = 0.005 and *P* < 0.001, respectively; Fig. 6g and h).

Then, we aimed at analyzing the receptors and/or tPA functional domains enrolled in APC maturation. Treatment of APCs with catalytically inactive tPA (tPA-GGACK) did not modify MHC-II<sup>+</sup> expression, although the difference with native tPA was not significant (tPA: DCs 121.12% ± 4.211, M 113.96% ± 4.406; *P* = 0.040 and *P* = 0.042, respectively, versus control condition; tPA GGACK: DCs 108.30% ± 4.166; M 105.21% ± 4.647, with respectively *P* = 0.156 and *P* = 0.440 versus control condition and *P* = 0.072; *P* = 0.186 versus tPA; Fig. 7a and b). Nonetheless, none of the tPA-mediated effects on APC polarization were modified by the addition of Glunomab® (Suppl. Fig. 7). These data

indicate that the action of tPA on APCs is not mediated via interaction with NMDAR.

On the other hand, it has been shown that tPA can act via non-proteolytic “growth factor-like” effects [30], some of them mediated by its EGF-like domain [4, 15]. The addition of the EGFR blocking agent AG1478 decreased MHC-II<sup>+</sup> expression on MHC-II<sup>+</sup> APCs as compared with the condition with tPA (DCs 55.49% ± 6.525; M 77.76% ± 2.249; *P* < 0.001, Fig. 7c and d). These data indicate that tPA promotes APC maturation partly by the activation of EGFR.

#### tPA-mediated APC polarization is accompanied by a higher MOG-specific T cell response

In order to determine whether the stimulatory effect of tPA on APC maturation may modify T cell functions, splenocytes extracted from EAE mice at the peak of the clinical course were cultured in the presence/absence of tPA, with or without *ex vivo* reactivation with MOG. In the absence of MOG reactivation, tPA by itself did not induce CD4<sup>+</sup> or CD8<sup>+</sup> T cell proliferation (CD4<sup>+</sup> 107.22% ± 10.94; CD8<sup>+</sup> 124.73% ± 57.01 data not shown). Condition with MOG reactivation showed a higher percentage of proliferation than control conditions for both CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells (CD4<sup>+</sup> 852.79% ± 125.03; CD8<sup>+</sup> 1525.90% ± 261.96, both *P* < 0.05, data not shown). Interestingly, tPA potentiated MOG-induced CD4<sup>+</sup> T cell proliferation (132.43% ± 6.28; *P* < 0.05, Fig. 7e). In line with the previous results about APC maturation, the stimulatory effect of tPA on MOG-activated CD4<sup>+</sup>T cell proliferation was abrogated when EGFR activity was blocked by AG1478 (81.88% ± 14.25; *P* < 0.05, Fig. 7e), while AG1478 did not modify MOG-induced APC proliferation in the absence of tPA (Fig. 7e). Remarkably, the stimulatory effect of tPA was not observed in MOG-activated CD8<sup>+</sup> T cells (108.26% ± 5.45; *P* > 0.05, Fig. 7f), in accordance with what was observed in the context of CD3/CD28 polyclonal activation of CD8<sup>+</sup> T cells extracted from tPA<sup>-/-</sup> mice (Fig. 3c).

Finally, to assess whether tPA can act directly on APCs, CD3 T cell-depleted splenocytes isolated from EAE mice at the peak of the clinical course were stimulated by MOG peptide in the presence/absence of tPA. After 24 h, Tag-it Violet-labelled sorted CD3 T cells from the spleen of EAE mice at the peak of the clinical course were added, and the medium was replenished in all culture conditions. In one experimental condition, tPA was removed at 24 h to check the specific effect of

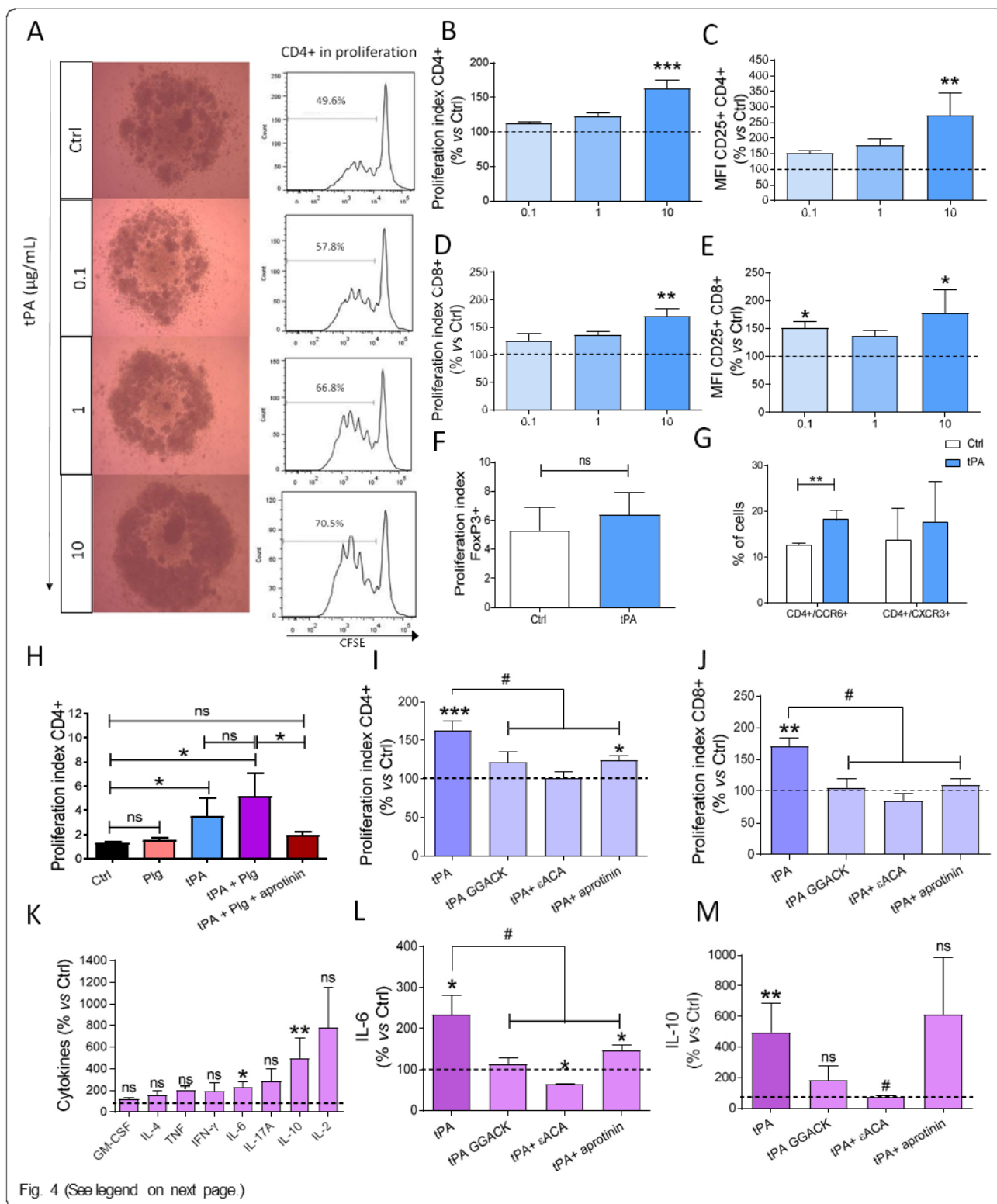


Fig. 4 (See legend on next page.)



(See figure on previous page.)

Fig. 4 tPA activates CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup>, but not FoxP3<sup>+</sup> T cells *in vitro* by a proteolytic mechanism. Splenocytes from naive mice were activated with anti-CD3 and anti-CD28 antibodies (both 1 µg/m) and treated in the indicated conditions for 4 days. a Proliferation estimated by observation under bright field binocular (left) and representative flow cytometry histograms for CFSE fluorescence (right), indicating the number of cells in proliferation state at the time of the experiment. Quantification of proliferation index (CFSE) and CD25<sup>+</sup> MFI (as index of activation) for b, c CD4<sup>+</sup> and d, e CD8<sup>+</sup> (N = 4–9). f Quantification of proliferation index for FoxP3<sup>+</sup> T cells (N = 3). Proliferation index are expressed as mean + SEM percentage vs control (Ctrl = 100% baseline). Activation is expressed as mean + SEM percentage of increase of CD25 MFI. g Quantification of CD4<sup>+</sup>/CCR6<sup>+</sup> and CD4<sup>+</sup>/CXCR3<sup>+</sup> T cells (N = 4). b–g \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs control. h–j Proliferation index of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T cells in the indicated treatment conditions. N = 5–9; \*P < 0.05, \*\*P < 0.01, \*\*\*P < 0.001 vs control; #P < 0.05 vs tPA. k, l Cytokine measurements (percentage of control) in activated splenocytes treated in the indicated conditions (N = 4–7). \*P < 0.05, \*\*P < 0.01 vs control; #P < 0.05 vs tPA

tPA over CD3 T cell-depleted splenocytes. Our data showed that tPA pretreatment of CD3 T cell-depleted splenocytes during the first 24 h increased their ability to potentiate CD4 T cell proliferation (MOG + tPA 24 h: 132.47% ± 3.52; P < 0.05 versus MOG, Fig. 7g). Interestingly, the presence of tPA during the whole experiment did not induce an additional proliferative effect on CD4 T cells (MOG + tPA 96 h: 136.81% ± 6.22; P < 0.05 versus MOG, Fig. 7g). On the other hand, tPA did not exert any significant effect on CD8 T cells (MOG + tPA 24 h: 92.55% ± 5.14; MOG + tPA 96 h: 81.55% ± 6.25, Fig. 7h). These results indicate that tPA can act directly on APC maturation during the first 24 h of exposition to potentiate MOG-activated CD4 T cell proliferation.

In sum, our data indicated that the direct and early effect of tPA on APC maturation and pro-inflammatory polarization resulted in amplified MOG-induced CD4<sup>+</sup> T cell response. This effect may explain the deleterious role of tPA in EAE.

## Discussion

Previous works reported that tPA expression is increased in the CNS during EAE [11, 31], a result which suggests an involvement of this serine protease in the EAE pathophysiology. Although tPA has been reported to induce neurotoxic effects [32], these

effects are unlikely to play a significant part in the processes reported here. In fact, genetically induced upregulation of tPA expression in neurons does not impact the score of EAE [31]. Furthermore, the motor symptoms observed in EAE correlate with both demyelination [33] and axonal injury [34] but not with neuronal death, which is hardly detectable in the spinal cord of MOG-induced EAE until late stages [35]. Thus, the pathophysiology of EAE and the timing of the effects observed in this work, where differences between tPA<sup>-/-</sup> and WT mice occur at early symptomatic stages, also argue against a significant implication of neuronal death.

Indeed, our study reports a deleterious role of tPA in EAE by an action on lymphoid and myeloid cell subsets by two complementary mechanisms: on the one hand, tPA directly increases T cell activation, proliferation and IL-6 secretion in a plasmin-dependent manner. On the other hand, tPA indirectly increases T cell proliferation by increasing the expression of MHC-II and costimulatory molecules in DCs and M<sub>1</sub>, by both proteolytic and growth factor-like effects. These elements may bring an explanation to the deleterious effect of endogenous tPA observed here in EAE and put forward complementary mechanisms of tPA in immune response.

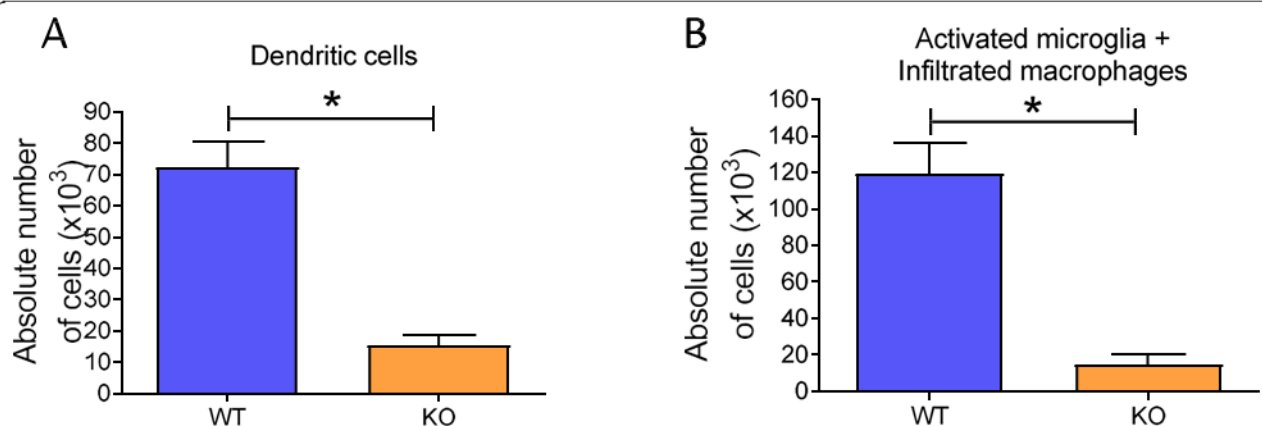
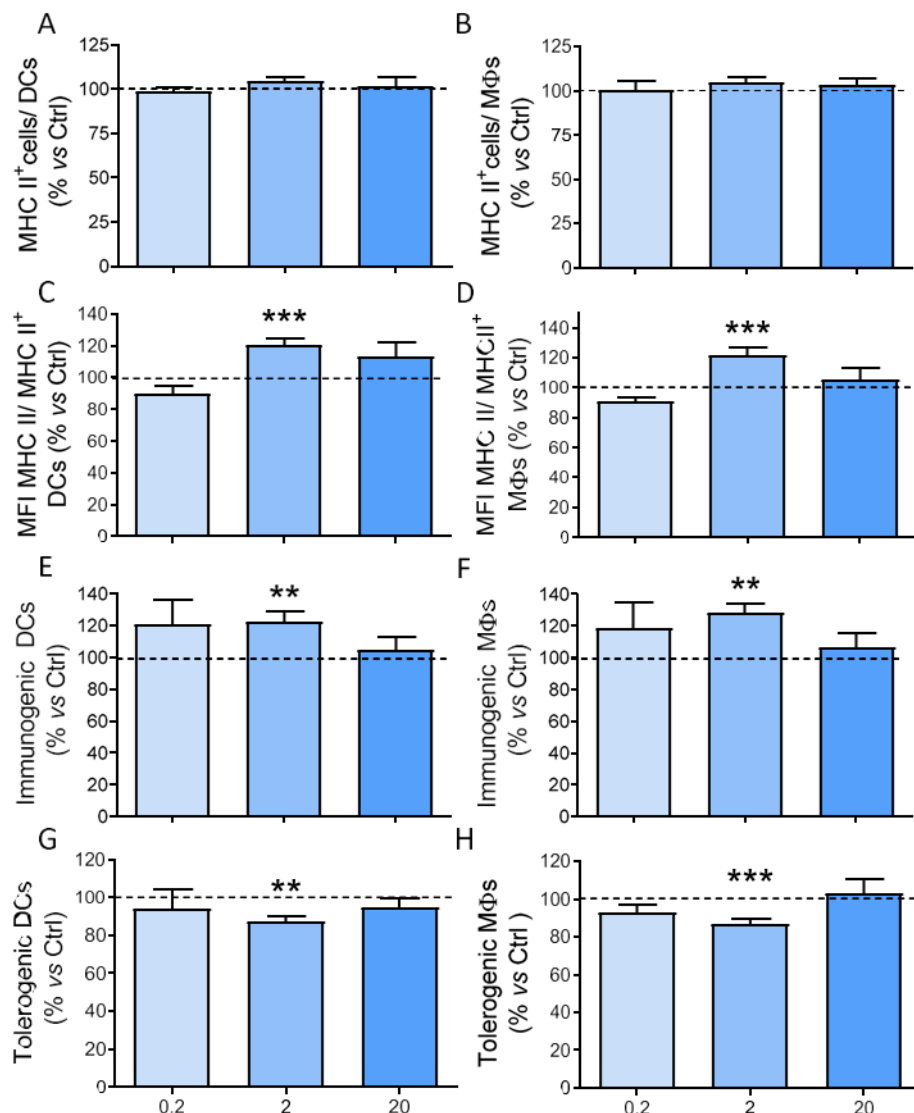


Fig. 5 tPA<sup>-/-</sup> mice show reduced myeloid cell infiltration than WT in the spinal cord. Absolute number of infiltrated a DCs and b M $\phi$ <sup>+</sup> activated microglia in half-spinal cords of WT and KO EAE mice measured by Masscyt cell counting and flow cytometry. Results are expressed as mean + SEM [N = 6 (WT) and N = 3 (tPA<sup>-/-</sup>)]. \*P < 0.05



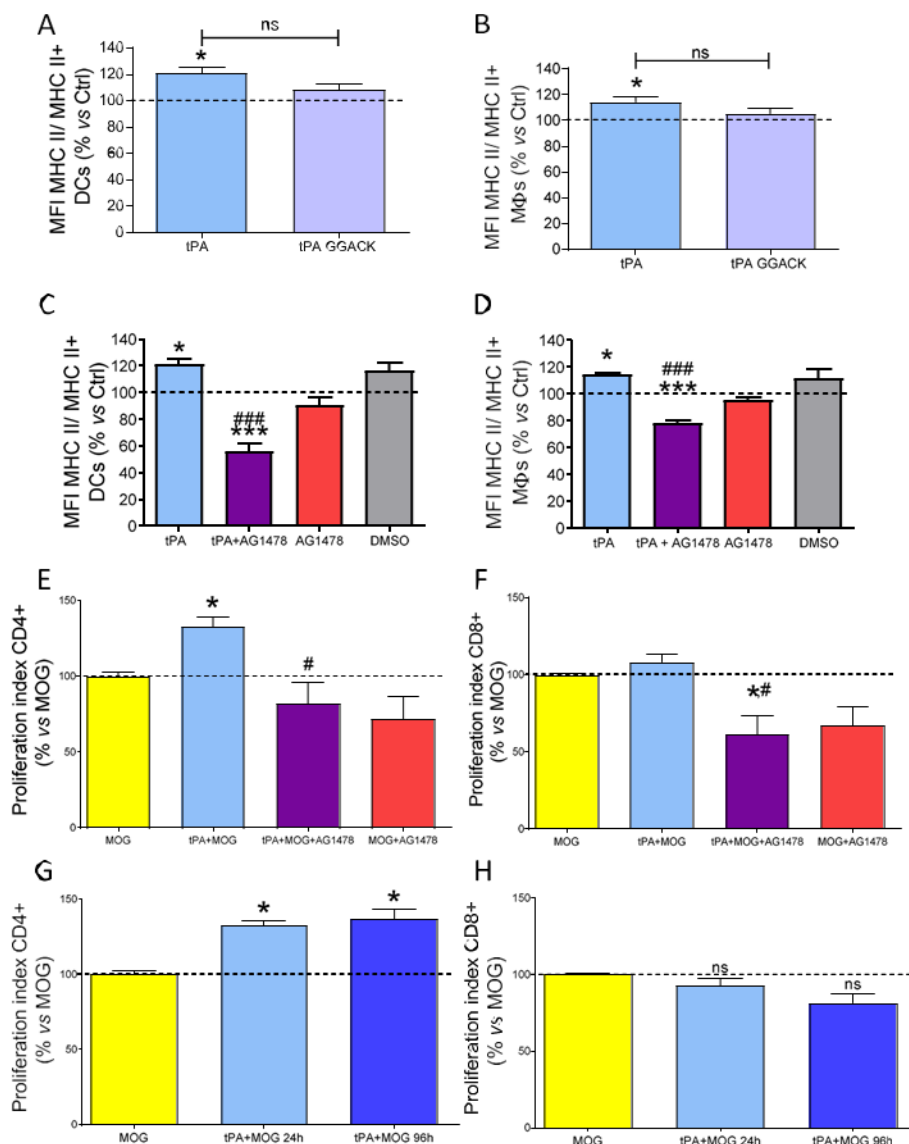


**Fig. 6** tPA polarizes splenic APCs from EAE mice towards a pro-inflammatory phenotype. Splenocytes extracted from EAE mice at the peak of the clinical course were treated in the indicated conditions. a, b Percentage of a CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>-DCs and b F4/80<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>-Mφ in each APC subpopulation. c, d MFI of MHC-II in APCs, e-h Percentage of e, f MHC-II<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> immunogenic and g, h and MHC-II<sup>+</sup> CD80<sup>-</sup> CD86<sup>-</sup> tolerogenic APCs in the presence of different tPA concentrations. In all cases, tPA at the concentrations of 0.2 and 20 µg/mL showed no differences. Results are expressed as mean + SEM (N = 5), \*P < 0.05

Previous data from the literature are contradictory about the role of tPA in neuroinflammation in EAE. Some reports indicate that tPA<sup>-/-</sup> mice present earlier and more severe disease than their WT counterparts, suggesting a protective role of tPA [12, 13, 36]. Other studies using tPA<sup>-/-</sup> mice, including the present one, argue for a deleterious effect of tPA [11]. These discrepancies could be explained by different experimental conditions, including different MOG doses, the use of MOG re-boost or differences in the age of mice, but also in environmental conditions [37]. These different conditions determine different EAE severity profiles between laboratories, in which the beneficial and deleterious effects

of tPA [38] may then express themselves differently. Nevertheless, repeated administration of tPA worsened the clinical scores of EAE and slightly anticipated its onset [39], which supports an adverse effect of tPA in this model. Moreover, our data showing that tPA enhances IFN-γ, a cytokine with encephalitogenic properties, are also in favor of a deleterious role of tPA in EAE.

The fact that tPA promotes T cell activation and proliferation is in agreement with recently published data [36]. The present study provides further elements by demonstrating that this effect is dependent of plasminogen activation into plasmin. However, the potential mechanisms downstream of plasmin activation that may



**Fig. 7** tPA stimulates MOG<sub>35-55</sub>-dependent APC maturation and T cell proliferation via its EGF-like domain. Splenocytes extracted from EAE mice at the peak of the clinical course were treated in the indicated conditions. a, b MHC-II MFI in a CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>-DCs and b F4/80<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>-MΦs exposed to 2 μg/mL of tPA or 2 μg/mL of tPA-GGACK. c, d Expression of MHC-II MFI in c CD11c<sup>+</sup>MHC-II<sup>+</sup>-DCs and d F4/80<sup>+</sup> MHC-II<sup>+</sup>-MΦs after combined treatment with 2 μg/mL of tPA and 5-μM EGFR inhibitor AG1478. e, f Cell proliferation index of e CD4<sup>+</sup> and f CD8<sup>+</sup> T cells after combined treatment with 5 μg/mL MOG<sub>35-55</sub>, 2 μg/mL of tPA and 5-μM EGFR inhibitor AG1478. *N* = 6–7 and \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs control; #*P* < 0.05, ###*P* < 0.001 vs tPA. g, h Cell proliferation index of sorted g CD4<sup>+</sup> and h CD8<sup>+</sup> T cells in co-culture with MOG-stimulated CD3 T cell-depleted splenocytes with/without 2 μg/mL of tPA during 24 or 96 h (*N* = 6–7 for a–f, *N* = 3 for g and h, and \**P* < 0.05, \*\**P* < 0.01, \*\*\**P* < 0.001 vs baseline; #*P* < 0.05, ###*P* < 0.001 vs tPA)

act on T cells in the context of EAE remain elusive. At least three potential candidates can be cited. First, tPA induces the release of the pro-form of matrix metalloproteinase 9 (pro-MMP9) from endothelial cells by activating the lipoprotein receptor-related protein-1 (LRP) receptor [40] and activates pro-MMP9 into its active form, MMP9 via plasminogen activation [41]. Remarkably, MMP9 is involved in T cell proliferation, as MMP9-deficient T cells display altered proliferative

ability [42]. Second, tPA activates heparin-bound EGF into free EGF, via the action of plasmin and matrix MMP9, leading to EGFR signalling in different cell types [43]. Third, plasmin is able to raise the bioavailability of the chemokine CCL21, known to regulate the homing of T cells and DCs towards lymphoid organs [44] and to act as a co-stimulatory molecule to promote T cell expansion and Th1 differentiation [45]. Interestingly, EGFR inhibition induces CD4<sup>+</sup> T cell anergy *in vitro* and

*in vivo* [46]. Further experiments may clarify whether MMP9, EGFR, and/or CCL21 participate in the mechanisms by which tPA promotes T cell proliferation and activation.

Our data emphasize plasmin-dependent immune functions of tPA in EAE. In accordance with our results, plasminogen deficiency in mice delays the onset and protects from demyelination in EAE [47]. Furthermore, plasmin is able to activate microglia [48], suggesting that tPA/plasmin axis is an important component to consider in future studies on the biological mechanisms underlying EAE.

Our data show that tPA acts also on myeloid cells by a distinct mechanism involving EGFR activation. By this action, tPA increases the expression of MHC-II and the co-stimulatory molecules CD80 and CD86 by DCs and M, leading to a polarization from a tolerogenic to an immunogenic activity state. Our data did not allow to firmly conclude on a possible implication of the proteolytic activity of tPA in these effects. This possibility should be more thoroughly addressed in further studies.

Our results were in contrast with a previous study reporting that tPA reduces macrophage response to LPS by inhibiting ERK pathway and cytokine production, an effect mediated *via* the combined action of NMDAR and LRP pathways [20]. The mechanisms implied are likely to be different from what described in the present work: the increase in antigen-presenting capacity of APCs, induced by tPA, is not prevented by Glunomab®, which points to the involvement of another pathway. In fact, in our co-culture system, the CD4 T cell proliferative effect of tPA on APC is reversed by EGFR inhibition, which indicates that tPA-mediated effects on antigen presentation are exerted *via* EGFR activation. The direct EGFR-mediated effect on T cell proliferation cannot be totally discarded in light of our observations. Nevertheless, pre-treatment of T cell-depleted splenocytes with tPA is sufficient to potentiate the proliferation of T cells added subsequently to the co-culture (Fig. 7g and h). This indicates that tPA-mediated effects on antigen presentation are directly exerted *via* EGFR and essentially mediated *via* an action on APCs. Our study is the first that correlates the expression of MHC-II molecules with the activation of EGFR by tPA. However, the downregulation of MHC-II expression by AG1478 in the absence of tPA may indicate that EGFR is intrinsically involved in antigen presentation. Interestingly, EGFR downstream signalling inhibition is a promising strategy in diverse tumor types by inducing MHC-II in APCs and breaking down tolerance [49]. Our data reinforces the idea of targeting EGFR activity as an interesting target to modulate MHC-II expression, either to potentiate it, as in the case of cancer, or to reduce it, as in the case of MS or other autoimmune diseases in which tolerance induction is

one of the golden aims in cell therapy-based strategies [50].

These data show that tPA can act on the myeloid population by mechanisms independent of plasmin generation and complete previous reports showing that tPA can activate microglial cells *via* its finger domain through annexin II [30]. In order to gain insights into the primary target cells of tPA action in EAE, further studies may be conceived. For instance, passive EAE experiments may be induced with encephalitogenic T cells that would be treated with tPA prior to adoptive transfer.

tPA-induced enhancement of IL-6 cytokine production by activated splenocytes is also in favor of a pro-inflammatory role of tPA in EAE. Indeed, this cytokine is crucial for neuroinflammation as illustrated by the fact that IL-6-deficient mice are resistant to EAE [51]. However, tPA also intriguingly increases IL-10 production, a cytokine with immunomodulatory functions. However, it should be kept in mind that IL-10, as many cytokines, may have dual effects depending on the context. For example, IL-10 may have immunostimulating properties by promoting the generation of cytotoxic T cells [52] and NK cells [53], or favoring the germinal center response [54]. So, further works are needed to explore the net effect of tPA on the cytokine network and neuroinflammation in the course of EAE.

## Conclusion

Our study opens new clues into the mechanisms by which tPA/plasmin axis participates in the pathogenesis of MS and its animal models. These mechanisms could be involved also in other neurological diseases such as Alzheimer's disease, amyotrophic lateral sclerosis and Parkinson's disease in which T cells are also involved [55]. Our study paves the way for further studies investigating the downstream targets involved in the pro-inflammatory effects of tPA in T cells and myeloid cells.

## Supplementary Information

The online version contains supplementary material available at <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02102-5>.

Additional file 1: Suppl Figure 1: Gating strategy and lymphoid cell response after EAE in WT and tPA<sup>-/-</sup> mice. (A) Representative gating strategy for absolute cell count analysis of leukocyte subsets in spinal cord homogenates (WT mouse, plateau phase of EAE). (B) CD3<sup>+</sup> leukocytes were gated for subpopulation analysis after using scattergram gates for viable leukocytes (in A). (C) representative flow cytometry plots for the assessment of intracellular cytokines IFN $\gamma$  and IL-17 in CD4<sup>+</sup> cells after EAE in WT and tPA<sup>-/-</sup>. Suppl Figure 2: T cell infiltration in the spinal cord of WT and tPA<sup>-/-</sup> EAE mice. Photomicrographs show representative images (from N=3) of indicated markers in spinal cord tissue samples of WT and tPA<sup>-/-</sup> mice at the EAE plateau phase (d20 $\pm$ 3) from (A) cervical, (B) upper thoracic, and (C) lumbar sacral. Suppl Figure 3: Glunomab does not prevent the effect of tPA on T cells. Splenocytes activated with both anti-CD3 $\epsilon$  and anti-CD28 antibodies were



treated or not with tPA at 10 µg/mL in presence of Glunomab or the isotypic antibody for 4 days. Proliferation index (%) of (A) CD4<sup>+</sup> and (B) CD8<sup>+</sup> T cells in the indicated conditions. Results are expressed as mean ± SEM (N=3). \**P*<0.05 vs control #*P*<0.05 vs indicated experimental group. Suppl Figure 4: Myeloid response of WT and tPA<sup>-/-</sup> mice at the plateau phase of EAE. Representative gating strategy for absolute cell count analysis of leukocyte subsets in spinal cord homogenates of WT and tPA<sup>-/-</sup> mice. CD3<sup>+</sup> leukocytes were gated for subpopulation analysis after using scattergram gates for viable leukocytes (see Suppl Fig 1A). Suppl Figure 5: Myeloid response to tPA treatment. Representative flow cytometry plots for (A) dendritic cells and (B) macrophages after tPA treatment (0–20 µg/mL). Suppl Figure 6: Dynamic modification of immunogenic and tolerogenic DC phenotype along the EAE clinical course. CD40 is highly present at the moment of maximum affection and decreased when symptoms partially recover. PD-L1 is increased after the recovery of the clinical symptoms. Asymptomatic immunized mice showed a high presence of PD-L1<sup>+</sup> tolerogenic DCs. C.S.= clinical score and dpi.= day post-immunization. Suppl Figure 7: Effect of tPA on APC maturation is not mediated by its ability to interact with NMDA receptor. Splenocytes extracted from EA mice at the peak of the clinical course were treated with 2 µg/mL tPA in presence of Glunomab or an isotypic antibody (A–H). The percentages of MHC-II<sup>+</sup>CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> immunogenic and MHC-II<sup>+</sup>CD80<sup>-</sup>CD86<sup>-</sup> tolerogenic APCs were determined by flow cytometry. Results are expressed as mean ± SEM (N=5); \**P*< 0.05, \*\**P*<0.01 and \*\*\**P*<0.001.

Additional file 2: Suppl. Table 1: Antibodies used in the present study. Each antibody is indicated with its target antigen, host species, clone number, isotype and commercial reference

#### Abbreviations

BBB: Blood–brain barrier; CSF: Cerebrospinal fluid; DC: Dendritic cells; dpi: Day post-immunization; EGF: Epidermal growth factor; EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis; FNY: Interferon-γ; IL: Interleukin; Mφ: Macrophages; MHC: Major histocompatibility complex; MOG: Myelin oligodendrocyte glycoprotein; MMP: Matrix metalloproteinase; MS: Multiple sclerosis; NMDAR: N-methyl-D-aspartate receptors; tPA: Tissue-type plasminogen activator

#### Acknowledgements

The authors would like to thank Isabelle Wagnon and Antoine Fournier for their help with EAE experiment, Barbara Delaunay for her help in microscopy, Laurent Lebowier for his technical input, Sara Martínez de Lizarrondo for her help with tPA activity and reagents, Rafael Lebrón-Galán and Isabel Machin-Díaz for their technical assistance, and Ángela Marquina for her help with the flow cytometry.

#### Authors' contributions

PH performed the experiments and wrote the article; CCT, AJM, WdS, CS, HL, SG, and LL performed experiments; MCO and IB performed experiments and drafted the paper; DV and BLM drafted the manuscript; DC, FD, and OT designed the experiments and wrote the article. The authors read and approved the final manuscript.

#### Funding

PH received fellowships from the Regional Council of Normandy, the *Établissement Français du sang* (EFS) and the *Association pour la Recherche sur la Sclérose En Plaques* (ARSEP). This work was supported by the Spanish *Instituto de Salud Carlos III* grants RD16-0015-0019, PI15/00963 and PI18/00357 (partially financed by FEDER: European Union "Unamano de hacer Europa"); ADEM-TO, ATORDEM and ESCLEROSIS MÚLTIPLE ESPAÑA DC is financed by SESCAM. MCO holds a postdoctoral contract from the Consejería de Sanidad de Castilla-La Mancha (I-2018\_07). CC-Tholds a predoctoral Research Training contract PI19/00132 from the *Instituto de Salud Carlos III* (partially financed by FSE "El FSE invierte en tu futuro"); Dr Clemente's group was sponsored by *Acitum Aeronáutica SLA*, *Fundación Galletas Coral*, and *Embudos y Jaramones España e Hijos*.

#### Availability of data and materials

The data generated during this study are available from the corresponding author on reasonable request.

#### Ethics approval and consent to participate

Animal experiments were performed following European, national, and institutional guidelines for the care and use of animals. All procedures were performed according to the guidelines of the institutional ethics committee (*Comité Normand d'éthique en matière d'expérimentation animale* (CeNomExa) and *Comité Ético de Experimentación Animal del Hospital Nacional de Paraplégicos*). Projects were submitted to and approved by these committees in accordance with the European directive no. 2013/63/UE (agreement number D14118001) and with the French and Spanish National and Regional Guidelines for Animal Experimentation and the Use of Genetically Modified Organisms (French Ministry of Research, project license number 026532, Decree 87/848; RD 53/2013 and 178/2004, Law 32/2007 and 9/2003, Decree 320/2010).

#### Consent for publication

Not applicable

#### Competing interests

The authors declare no competing interests.

#### Author details

<sup>1</sup>UNCAEN, INSERM, GP Cyceron, Institut Blood and Brain@Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PHIND), Normandie Univ., Caen, France. <sup>2</sup>Present address: Theodor Kocher Institute, University of Bern, Freiestrasse 1, CH-3012 Bern, Switzerland. <sup>3</sup>Grupo de Neuroinmuno-Reparación, Hospital Nacional de Paraplégicos, Finca La Peraleda s/n, 45071 Toledo, Spain. <sup>4</sup>Hospital Nacional de Paraplégicos, Finca La Peraleda s/n, 45071 Toledo, Spain. <sup>5</sup>Department of Clinical Research, Caen University Hospital, CHU, Caen, France. <sup>6</sup>Department of Immunology and Immunopathology, Caen University Hospital, CHU, Caen, France.

Received: 10 June 2020 Accepted: 3 February 2021

Published online: 20 February 2021

#### References

- Compston A, Coles A. Multiple sclerosis. *Lancet*. 2008;372:1502–17.
- Rijken DC, Collen D. Purification and characterization of the plasminogen activator secreted by human melanoma cells in culture. *J Biol Chem*. 1981; 256:7035–41.
- Angles-Cano E, Balaton A, Bonnicie BL, Genot E, Elion J, Sultan Y. Production of monoclonal antibodies to the high fibrin-affinity, tissue-type plasminogen activator of human plasma. Demonstration of its endothelial origin by immunolocalization. *Blood*. 1985;66:913–20.
- Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macez R, Hommet Y, Obiang P, et al. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. *J Exp Med*. 2011;208:1229–42.
- Docagne F, Nicole O, Marti H, MacKenzie ET, Buisson A, Vivien D. Transforming growth factor-beta1 as a regulator of the serpins-t-PA axis in cerebral ischemia. *FASEB J*. 1999;13:1315–24.
- Soreq H, Miskin R. Plasminogen activator in the rodent brain. *Brain Research*. 1981;216:361–74.
- Mehra A, Ali C, Parcq J, Vivien D, Docagne F. The plasminogen activation system in neuroinflammation. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2016;1862:395–402.
- Akenami FO, Sirén V, Koskineniemi M, Simes MA, Teräsväin H, Vaheiri A. Cerebrospinal fluid activity of tissue plasminogen activator in patients with neurological diseases. *J Clin Pathol*. 1996;49:577–80.
- Özner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G, et al. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteinases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. *J Neuropathol Exp Neurol*. 1996;55:1194–204.
- Ransohoff RM, Engelhardt B. The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system. *Nature Reviews Immunology*. 2012;12:623–35.
- Lu W, Bhasin M, Tsirka SE. Involvement of tissue plasminogen activator in onset and effector phases of experimental allergic encephalomyelitis. *The Journal of Neuroscience*. 2002;22:10781–9.
- Dahl LC, Nasa Z, Chung J, Niego B, Tarlac V, Ho H, et al. The influence of differentially expressed tissue-type plasminogen activator in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *PLoS*

- One [Internet]. 2016 [cited 2019 Sep 5];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4948890/>
13. East EB, Baker D, Pyce G, Lijnen HR, Quzner ML, Geric D. A role for the plasminogen activator system in inflammation and neurodegeneration in the central nervous system during experimental allergic encephalomyelitis. *Am J Pathol.* 2005;167:545–54.
  14. Hébert M, Lesept F, Vivien D, Marez R. The story of an exceptional serine protease, tissue-type plasminogen activator (tPA). *Revue Neurologique.* 2016;172:186–97.
  15. Leonetti C, Marez R, Ptusot M, Hommet Y, Bronsard J, Fournier A, et al. Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination. *Mol Neurodegener.* 2017;12:20.
  16. Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SMA, Leyen T, van het Hof B, Couraud P-O, et al. Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier. *The Journal of Immunology.* 2008;181:3667–74.
  17. Marez R, Ortega MC, Bardou I, Mehra A, Fournier A, der Pol V, et al. Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain.* 2016;139:2406–19.
  18. András E, Deli MA, Veszeka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. *J Cereb Blood Flow Metab.* 2007;27:1431–43.
  19. Lesept F, Chevilly A, Jezequel J, Ladépêche L, Marez R, Aimable M, et al. Tissue-type plasminogen activator controls neuronal death by raising surface dynamics of extrasynaptic NMDA receptors. *Cell Death Dis.* 2016;7:e2466.
  20. Mantuano E, Azmoon P, Briffault C, Banki MA, Gilder AS, Campana WM, et al. Tissue-type plasminogen activator regulates macrophage activation and innate immunity. *Blood.* 2017;130:1364–74.
  21. Tsirka SE, Rogove AD, Bugge TH, Degen JL, Strickland SA. An extracellular proteolytic cascade promotes neuronal degeneration in the mouse hippocampus. *J Neurosci.* 1997;17:543–52.
  22. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieders L, Ream B, Degen J, Bronson R, et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. *Nature.* 1994;368:419–24.
  23. Mishra PK, Hsueh H, Ouyang S, Kastin AJ, Wu X, Pan W. Loss of astrocytic leptin signaling worsens experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain, behavior, and immunity* [Internet]. 2013 [cited 2019 Sep 6];34. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3818286/>
  24. Moliné-Velázquez V, Ortega MC, Vila del Sol V, Melero-Jerez C, de Castro F, Clemente D. The synthetic retinoid Am80 delays recovery in a model of multiple sclerosis by modulating myeloid-derived suppressor cell fate and viability. *Neurobiol Dis.* 2014;67:149–64.
  25. Briens A, Bardou I, Lebas H, Miles LA, Parmer RJ, Vivien D, et al. Astrocytes regulate the balance between plasminogen activation and plasmin clearance via cell-surface actin. *Cell Discov.* 2017;3:17001.
  26. Melero-Jerez C, Suardaz M, Lebrón-Galán R, Marín-Bañasco C, Oliver-Martos B, Machin-Díaz I, et al. The presence and suppressive activity of myeloid-derived suppressor cells are potentiated after interferon- $\beta$  treatment in a murine model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2019;127:13–31.
  27. Nicole O, Docagne F, Ali C, Margail I, Carmeliet P, Mackenzie ET, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator enhances NMDA receptor-mediated signaling. *Nat Med.* 2001;7:59–64.
  28. Boldyrev AA, Kazay M, Leinsoo TA, Mashkina AP, Tyulina OV, Johnson P, et al. Rodent lymphocytes express functionally active glutamate receptors. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004;324:133–9.
  29. Mashkina AP, Tyulina OV, Solovyova TI, Kovalenko EJ, Kanevski LM, Johnson P, et al. The excitotoxic effect of NMDA on human lymphocyte immune function. *Neurochem Int.* 2007;51:356–60.
  30. Siao C-J, Tsirka SE. Tissue plasminogen activator mediates microglial activation via its finger domain through annexin I. *J Neurosci.* 2002;22:3352–8.
  31. Dahl LC, Nasa Z, Chung J, Niego B, Taric V, Ho H, et al. The influence of differentially expressed tissue-type plasminogen activator in experimental autoimmune encephalomyelitis: implications for multiple sclerosis. *PLoS One* [Internet]. 2016 [cited 2020 Dec 2];11. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4948890/>
  32. Yepes M, Roussel BD, Ali C, Vivien D. Tissue-type plasminogen activator in the ischemic brain: more than a thrombolytic. *Trends Neurosci.* 2009;32:48–55.
  33. Melero-Jerez C, Alonso-Gómez A, Morillas E, Lebrón-Galán R, Machin-Díaz I, de Castro F, et al. The proportion of myeloid-derived suppressor cells in the spleen is related to the severity of the clinical course and tissue damage extent in a murine model of multiple sclerosis. *Neurobiol Dis.* 2020;140:104889.
  34. Budde MD, Kim JH, Liang HF, Russell JH, Cross AH, Song SK. Axonal injury detected by in vivo DTI correlates with neurological disability in a mouse model of multiple sclerosis. *NMR Biomed.* 2006;21:589–97.
  35. Bannerman PG, Hahn A, Ramirez S, Morley M, Bönnemann C, Yu S, et al. Motor neuron pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis: studies in THY1-YFP transgenic mice. *Brain.* 2005;128:1877–86.
  36. Mizrahi T, Gur-Wahnon D, Al-Roof Higazi A, Brenner T. Role of tissue plasminogen activator in clinical aggravation of experimental autoimmune encephalomyelitis and its therapeutic potential. *Cellular Immunology.* 2020;348:104040.
  37. Álvarez-Sánchez N, Cruz-Chamorro I, Álvarez-López AI, López-González A, Lacalle Remigio JR, Lardone PJ, et al. Seasonal variations in macrophages/microglia underlie changes in the mouse model of multiple sclerosis severity. *Mol Neurobiol.* 2020;57:4082–9.
  38. Mehra A, Ali C, Parcq J, Vivien D, Docagne F. The plasminogen activation system in neuroinflammation. *Biochim Biophys Acta.* 1862:2016:395–402.
  39. Wang J, Zhang X, Mu L, Zhang M, Gao Z, Zhang J, et al. t-PA acts as a cytokine to regulate lymphocyte-endothelium adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Immunol.* 2014;152:90–100.
  40. Wang X, Lee SR, Arai K, Lee SR, Tsuji K, Rebeck GW, et al. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. *Nat Med.* 2003;9:1313–7.
  41. Davis GE, Pirtar Allen KA, Salazar R, Maxwell SA. Matrix metalloproteinase-1 and -9 activation by plasmin regulates a novel endothelial cell-mediated mechanism of collagen gel contraction and capillary tube regression in three-dimensional collagen matrices. *J Cell Sci.* 2001;114:917–30.
  42. Benson HL, Mobashery S, Chang M, Kheradmand F, Hong JS, Smith GN, et al. Endogenous matrix metalloproteinases 2 and 9 regulate activation of CD4+ and CD8+ T cells. *Am J Respir Cell Mol Biol.* 2011;44:700–8.
  43. Hurtado M, Lozano JJ, Castellanos EL, López-Fernández LA, Harshman K, Martínez-A C, et al. Activation of the epidermal growth factor signalling pathway by tissue plasminogen activator in pancreas cancer cells. *Gut.* 2007;56:1266–74.
  44. Lorenz N, Loef EJ, Kelch ID, Verdon DJ, Black MM, Middleditch MJ, et al. Plasmin and regulators of plasmin activity control the migratory capacity and adhesion of human T cells and dendritic cells by regulating cleavage of the chemokine CCL21. *Immunol Cell Biol.* 2016;94:955–63.
  45. Flanagan K, Moroziewicz D, Kwak H, Hörig H, Kaufman HL. The lymphoid chemokine CCL21 costimulates naive T cell expansion and Th1 polarization of non-regulatory CD4+ T cells. *Cell Immunol.* 2004;231:75–84.
  46. Zeboudj L, Maitre M, Guyonnet L, Lauans L, Joffre J, Lemaire J, et al. Selective EGF-receptor inhibition in CD4+ T cells induces anergy and limits atherosclerosis. *J Am Coll Cardiol.* 2018;71:160–72.
  47. Shaw MA, Gao Z, McElhinney KE, Thornton S, Flick MJ, Lane A, et al. Plasminogen deficiency delays the onset and protects from demyelination and paralysis in autoimmune neuroinflammatory disease. *J Neurosci.* 2017;37:3776–88.
  48. Min K, Jou I, Joe E. Plasminogen-induced IL-1 $\beta$  and TNF- $\alpha$  production in microglia is regulated by reactive oxygen species. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;312:969–74.
  49. Kumai T, Matsuda Y, Okawa K, Aoki N, Kimura S, Harabuchi Y, et al. EGFR inhibitors augment antitumor helper T-cell responses of HER family-specific immunotherapy. *Br J Cancer.* 2013;109:2155–66.
  50. Casauberta-Sera S, Costa C, Evarch H, Mansilla MJ, López-Estévez S, Martorell L, et al. Myeloid-derived suppressor cells expressing a self-antigen ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis. *Exp Neurol.* 2016;286:50–60.
  51. Eugster HP, Frei K, Kopf M, Lassmann H, Fontana A. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *Eur J Immunol.* 1998;28:2178–87.
  52. Mumm JB, Emmerich J, Zhang X, Chan I, Wu L, Mauze S, et al. IL-10 elicits IFN $\gamma$ -dependent tumor immune surveillance. *Cancer Cell.* 2011;20:781–93.
  53. Qian C, Jiang X, An H, Yu Y, Guo Z, Liu S, et al. TLR agonists promote ERFK-mediated preferential IL-10 production of regulatory dendritic cells (diffDCs), leading to NK-cell activation. *Blood Am Soc Hematol.* 2006;108:2307–15.

54. Laidlaw BJ, Lu Y, Amezcua RA, Weinstein JS, Vander Heiden JA, Gupta NT, et al. Interleukin-10 from CD4+ follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. *Sci Immunol*. 2017;2.
55. Schetters STT, Gomez-Nicola D, Garcia-Vallejo JJ, Van Kooyk Y. Neuroinflammation: microglia and T cells get ready to tango. *Front Immunol* [Internet]. 2018 [cited 2019 Sep 27];8. Available from: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5788906/>

### Publisher's Note

Springer Nature remains neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Ready to submit your research? Choose BMC and benefit from:

- fast, convenient online submission
- thorough peer review by experienced researchers in your field
- rapid publication on acceptance
- support for research data, including large and complex data types
- gold Open Access which fosters wider collaboration and increased citations
- maximum visibility for your research: over 100M website views per year

At BMC, research is always in progress.

Learn more [biomedcentral.com/submissions](https://biomedcentral.com/submissions)







## **Tissue-plasminogen activator alters the phenotype of splenic mononuclear phagocyte cells in acute inflammation**

Seillier Célia<sup>a</sup>, **Lesec Léonie**<sup>a</sup>, Hélie Pauline<sup>a,1</sup>, Vivien Denis<sup>a,b</sup>, Docagne Fabian<sup>a</sup>, Le Mauff Brigitte<sup>a,c</sup>, Toutirais Olivier<sup>a,c</sup>

<sup>a</sup> Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, GIP Cyceron, Institut Blood and Brain @Caen-Normandie (BB@C), UMR-S U1237, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Caen, FRANCE.

<sup>b</sup> Department of clinical research, Caen University Hospital, CHU Caen, France.

<sup>c</sup> Department of Immunology and Histocompatibility (HLA), Caen University Hospital, CHU Caen, France.

\*Corresponding author: Olivier TOUTIRAIS, PhD. Inserm U1237, PhIND, Institut BB@C, Centre Cyceron, BP5229, 14074 Caen Cedex, France. Tel: +33 231470265.

Email: [toutirais-o@chu-caen.fr](mailto:toutirais-o@chu-caen.fr).

<sup>1</sup>Present address: Theodor Kocher Institute, University of Bern, Freiestrasse 1, CH-3012, Bern, Switzerland



## ABSTRACT

Tissue-plasminogen activator (tPA) is a serine protease well known for its fibrinolytic function. Recent studies indicate that tPA, could also modulate inflammation via plasmin generation and/or by receptor mediated signaling *in vitro*. However, the contribution of tPA in inflammatory processes *in vivo* has not been fully addressed. Using tPA-deficient mice, we have analyzed the effect of lipopolysaccharide (LPS) challenge on the phenotype of macrophages and dendritic cells (DCs) in spleen. Twenty-four hours after endotoxin injection, we found that tPA strengthened the macrophage phenotype shift toward a pro-inflammatory M1 phenotype. Unexpectedly, LPS induced a deep downregulation of major histocompatibility class (MHC) II molecule level on macrophages and on a conventional DC (cDC) subset but this effect is counterbalanced by tPA. The serine protease promoted the expression of the costimulatory CD86 on macrophages but did not influence the frequency of immunogenic MHCII<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> macrophages that was enhanced by LPS. Expression level of the CD11b integrin, known as a tPA receptor, was upregulated on macrophages suggesting that tPA effects could be amplified during inflammation. Finally, we reported that the relative frequency of cDC1 and cDC2 that are professional antigen-presenting cells particularly important for eliciting T cell response was modified in mice lacking of tPA. Our finding indicate that the role of tPA takes part at the interface between inflammation and adaptive immunity by promoting M1 phenotype, MHC class II and CD86 expression and modulating the distribution of cDC1 and cDC2.

## INTRODUCTION

Inflammation is a host protective mechanism against invading microbial pathogens and tissue damage. It is a highly complex biological process and failure of regulatory mechanisms is associated with many diseases such as inflammatory bowel diseases, psoriasis or atherosclerosis [1-4]

Macrophages and dendritic cells (DCs) belong to the mononuclear phagocyte system and are major actors of the inflammatory response. Through specific receptors, they are able to sense microbial components and molecules derived from tissue damage. Recognition of these danger signals leads to altered expression of major histocompatibility complex (MHC) and costimulatory molecules such as CD80 and CD86; and pro-inflammatory cytokines that are required to activate adaptive immune response. Macrophages are a heterogeneous population of immune cells and, schematically can polarize into two phenotypes: classical activated macrophages (M1) and alternatively activated macrophages (M2). M1 macrophages have a pro-inflammatory phenotype with pathogen-killing abilities and expressed the markers inducible nitric oxide synthase (iNOS) and CD38 while anti-inflammatory M2 macrophages promote cell proliferation and tissue repair; and are defined by the markers Arginase-1 and CD206 [5,6]

DCs are considered as the most efficient antigen presenting cells capable of efficiently taking up and presenting antigens to naïve T cells, thus initiating the adaptive immune response. DCs also play a crucial role in maintenance of immune tolerance to self-antigens. While the lineage of DCs is diverse, conventional DCs (cDCs) expressing CD11c are the dominant subset in the spleen [7]. Using the integrin adhesion molecule CD11b, cDCs can be divided into two subtypes: cDC1 are MHC II<sup>+</sup>/CD11b<sup>-</sup> whereas cDC2 have a MHCII<sup>+</sup>/CD11b<sup>+</sup> phenotype. Specific functions of each subset are not

completely understood but some reports suggest that cDC1 are highly specialized in cross-presentation and activation of cytotoxic T cells, whereas cDC2 preferentially stimulate helper T responses [8,9].

In steady state, a pool of specialized DCs called “tolerogenic DCs” was found in the spleen of mice [10]. Tolerogenic DCs induce multiple mechanisms of immune tolerance including T cell anergy or generation of peripheral regulatory T cells [11]. Tolerogenic DCs display an immature phenotype with low expression of MHC II and costimulatory molecules (CD80, CD86) on their surface [12] .

Important bidirectional interactions exist between hemostasis and inflammation, two biological systems that are phylogenetically linked as host defense mechanisms [13-15]. Plasminogen (PLG) activation system regulates the fibrinolysis and extracellular matrix degradation. The tissue plasminogen activator (tPA) is a serine-protease that cleaves the zymogen PLG into plasmin, a key enzyme that degrades fibrin of bloodclot. Beside its critical function in the fibrinolytic system, many reports indicate that tPA has also a complex role in inflammation and innate immunity [16-18]. Contrasting effects of tPA are dependent from its proteolytic activity or are achieved by a “cytokine - like” mode through interactions with specific receptors [19]. *In vitro*, tPA stimulates pro-inflammatory pathways and cytokines in macrophages *via* the generation of plasmin [20-22]. On the other hand, tPA inhibits lipopolysaccharide-induced-macrophage activation by interacting with the N-methyl-D-aspartate Receptor (NMDA-R) [23]. In a murine *E. coli* peritonitis model, tPA which is up-regulated in the liver and in the lung during infection has a protective effect [24]. tPA has also deleterious effects in inflammation. Indeed, Guo *et al* showed that tPA-deficient mice had significantly higher rates of survival than WT mice in a model of sepsis induced by *Staphylococcus aureus* [25]. Paradoxically, Sugimoto *et al* showed that pleural injection of PLG and plasmin induced a

switch of macrophage polarization toward a M2 phenotype suggesting that tPA may also contribute to the resolution of acute inflammation [26].

In the present study, the role of the serine protease in acute inflammation was investigated by injecting LPS in tPA- deficient mice. By analysing the distribution of mononuclear phagocytes in the spleen, we showed that tPA favors LPS-induced M1 polarization but also hampered LPS inhibitor effect by increasing MHCII molecule expression on macrophages and cDC. While tPA does not modify the proportion of immunogenic macrophages expressing MHCII and costimulatory molecules, it modifies the frequencies of cDC1 and cDC2 suggesting a contribution of the serine protease in the outcome of the adaptive response.

## MATERIALS AND METHODS

### ***Mice***

tPA<sup>-/-</sup> (C57BL/6J background) and control C57BL/6J mice, aged 8-12 weeks, were provided by the *Centre Universitaire de Ressources Biologiques* (CURB, Normandy-University, France). tPA NULL mice were generated by a unique deletion of the exon-3 of the *Plat* gene, to avoid possible off target effect. Mice were housed in our local conventional animal facilities at 21°C in a 12 h light/dark cycle with food and water *ad libitum*. All procedures were performed according to the guidelines of the institutional ethics committee CENOMEXA (*Comité Normand d'éthique en matière d'expérimentation animale*). This was submitted to this committee for approval in accordance with the European directive n° 2013/63/UE (agreement number D14118001) and with the French and Regional Guidelines for Animal Experimentation and the Use of Genetically Modified Organisms (French Ministry of Research, project license #29143).

### ***LPS Challenge.***

tPA<sup>-/-</sup> mice were injected intra peritoneally with 1 mg/kg LPS (Sigma-Aldrich). Control mice received an equivalent volume of normal saline. 24 h later, mice were deeply anesthetized with 5% isoflurane (Aerrane, Baxter) and euthanized by cervical dislocation. The spleens were collected, as well as the blood by intracardiac puncture.

### ***Isolation of leukocytes from spleen***

After mechanical disruption of the spleen, cell suspension was filtered through a 40 µm filter (Beckton Dickinson) and erythrocytes were lysed with hypotonic buffer [0.8% NH<sub>4</sub>Cl, 0.1 mM EDTA, KHCO<sub>3</sub>, pH 7.4 (Stemcell Technologies)]. Splenocytes were resuspended in Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM, Gibco) supplemented

with 10% heat inactivated fetal bovine serum (FBS, Stemcell Technologies), 2.5% (v/v) hepes (Fisher) and 1% penicillin/streptomycin (Gibco).

### ***Flow cytometry***

Splenocytes were resuspended in 50  $\mu$ l of staining buffer and Fc receptors were blocked with 10  $\mu$ g/mL anti-CD16/CD32 antibodies (BD Biosciences) for 15 min at 4°C. Cells were then labelled for cell surface markers with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (Table 1) 10 min in the dark at 4 °C and 7AAD (BioLegend) was added 15 min before analysis by flow cytometry. For intracellular staining, cells were fixed and permeabilized using “Inside stain” kit according to manufacturer’s protocol (Miltenyi Biotec) before labelling with fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies (Table 1). Samples were acquired on a FACSVerse (Beckton Dickinson) and data analyzed with the FlowJo 7.6.5 software (TreeStar Inc.).

### ***Statistical analysis***

Results are shown as the median  $\pm$  SD. Statistical analyses were performed using the Graphpad Prism 9.0 software. P values were calculated by one-way ANOVA for non-parametric data (Kruskal-Wallis test) with Dunn’s post-hoc test (multiple comparisons).  $P < 0.05$  is considered statistically significant. The ROUT method was used to determine presence of outliers (Q=1%).



## RESULTS

### *Phenotype of splenic macrophages after LPS challenge*

Several reports showed that tPA is involved in the regulation of macrophage and DC activation *in vitro* [20-22,27]. However, the role of tPA in inflammation has been poorly investigated *in vivo*. In this study, LPS challenge for 24h did not modify the absolute number and the frequency of macrophages (defined as F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> cells) in spleen from WT or tPA-deficient mice (Fig 1A-C). By analyzing macrophage activation markers, we observed that most of macrophages did not express MHCII molecules in sham condition whereas there was a trend for an increase of MHCII<sup>+</sup> macrophage frequency after LPS treatment. Nevertheless, the level of MHCII molecules was decreased in macrophages after LPS treatment, and significantly more in tPA-deficient mice (MFI Sham WT 5161 ± 851 vs LPS WT 3081 ± 970 and MFI Sham tPA<sup>-/-</sup> 816 ± 471 vs LPS tPA<sup>-/-</sup> 2368 ± 113, P=0,0025; Fig 1D).

The acute inflammation differently modulates the expression of the CD80 and CD86 costimulatory molecules on macrophages. Indeed, exposure to LPS significantly increased the percentage of CD80<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> (Sham WT 11,8 ± 2,3 % vs LPS WT 24.48 ± 7.2% P=0,0353) but not CD80<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>/MHCII<sup>-</sup> splenic macrophages from WT mice. The opposite effect was observed in tPA<sup>-/-</sup> mice (Fig 1C). Regarding the cellular level of costimulatory molecules after LPS challenge, CD80 was up-regulated in MHCII<sup>-</sup> macrophages in WT mice (MFI Sham WT 682 ± 66 vs LPS WT 881 ± 93, P=0,0253) while CD86 was down-regulated in MHCII<sup>+</sup> macrophages from tPA-deficient mice exposed to LPS (MFI LPS WT 1150 ± 969.7 vs LPS tPA<sup>-/-</sup> 1013 ± 62, P=0,0353; Fig 1D).

After LPS injection, there was a trend for an increase of CD11b integrin expression in MHCII<sup>+</sup> macrophages from WT mice while in mice lacking of tPA, CD11b is significantly

up-regulated in both MHCII<sup>-</sup> (MFI Sham tPA<sup>-/-</sup> 22452 ± 2091 vs LPS tPA<sup>-/-</sup> 34934 ± 5908, P=0, 0050) and MHCII<sup>+</sup> macrophages (MFI Sham tPA<sup>-/-</sup> 21159 ± 1586 vs LPS tPA<sup>-/-</sup> 49995 ± 4803, P=0, 0227) (Fig 1D).

Although CD11c is described as DC marker, many reports described expression of its integrin on lymphoid or non-lymphoid tissue macrophages [28,29]. CD11c<sup>+</sup> macrophage frequency is not affected neither by LPS nor by the lack of tPA (Supplementary data 1). Their phenotype was comparable to total splenic macrophages except the percentage of CD80<sup>+</sup>/CD86<sup>+</sup>/MHCII<sup>+</sup> cells which was after LPS injection, without effect of tPA deficiency.

### ***tPA is involved in M1/M2 macrophage polarization***

Since it was reported that tPA could influence M1/M2 macrophage polarization in chronic renal disease, we examined the impact of tPA deficiency in the differentiation state of splenic macrophages upon acute inflammation (ref). LPS challenge induced an increase of M1 macrophages (iNOS<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>) from WT mice that is not observed in mice lacking of tPA (Fig 2A). Among these M1 macrophages, the frequency of MHCII<sup>+</sup> macrophages and the MHCII level were significantly lower in tPA-deficient as compared to WT mice after LPS stimulation.

We did not notice any modification of M2 macrophage (CD206<sup>+</sup> Arg1<sup>+</sup>) frequency in inflammation condition with or without tPA (Fig 2B). However, expression level of CD206 is significantly reduced in tPA<sup>-/-</sup> but not WT mice after LPS treatment.

### ***tPA modifies splenic cDC distribution following LPS challenge***

A decrease of total DCs (F4/80<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup>) was observed in spleen from WT but not tPA<sup>-/-</sup> mice treated with LPS (Fig 3A and B). In LPS-challenged tPA<sup>-/-</sup> mice, the frequency



of cDC1 (CD11b<sup>-</sup> MHCII<sup>+</sup>) was significantly decreased while the frequency of cDC2 (CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>) was increased, as compared to the sham condition (Fig 3C and D). No modification of cDC frequency was observed in LPS-treated mice.

cDC1 expressed a higher level of MHCII molecules than cDC2 or macrophages. The level of MHCII molecules on cDC1-like was not modified by LPS in both strains while in cDC2, LPS reduced MHCII expression, significantly in mice lacking of tPA.

In steady state, the costimulatory molecules CD80 and 86 were weakly expressed in both cDC subsets. LPS treatment increased the frequency of CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> cDCs at the same level as MHCII<sup>+</sup> macrophages (about 25% of CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> cells after LPS injection). In addition, cDC1 from tPA<sup>-/-</sup> mice are more prone to an increase of CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> cell frequency than cDC2-like.

We distinguished three tolerogenic DC subsets that were not quantitatively modified by LPS treatment in both WT and tPA<sup>-/-</sup> mice (Supplementary data 2). The CD11b<sup>+</sup> subset was the less abundant but displayed the higher proportion of CD80<sup>+</sup>CD86<sup>+</sup> cells. When comparing the costimulatory molecule expression magnitude, we noted that CD11b<sup>-</sup> and CD11b<sup>low</sup> tolerogenic DCs expressed lower levels of CD80 molecules as compared to the CD11b<sup>+</sup> subset, even in inflammatory context (supplementary data 3. The CD11b<sup>-</sup> subset expressed the higher level of CD86 molecules after LPS stimulation). As observed in MHCII<sup>+</sup> macrophages, level of CD11b expression was increased in CD11b<sup>low</sup> but on CD11b<sup>+</sup> tolerogenic DCs upon inflammatory condition.

### ***tPA modulates T cell activation after LPS treatment***

Few data exist on the effects of LPS injection on splenic T cell activation. LPS increased significantly the frequency of CD25<sup>+</sup> and CD69<sup>+</sup> but not CD44<sup>+</sup> T cells among

splenocytes in tPA<sup>-/-</sup> mice while only a trend for an increase is observed in WT splenocytes (Fig 4A-C). cells.

## DISCUSSION

Previous studies have shown that tPA is a modulator of inflammation that, for instance, regulates the biology of macrophages [23,30]. However, little information exists about the role of the serine protease in inflammatory processes *in vivo*. Although LPS has been widely used to stimulate macrophages *in vitro*, its impact *in vivo* on splenic mononuclear phagocyte phenotype has been poorly studied. In resting state, a small population of splenic macrophages expressing MHCII and costimulatory molecules harbor an « immunogenic » phenotype (ref). In our experiments, *in vivo*, LPS treatment up-regulated the frequency of MHCII<sup>+</sup> macrophages but also dramatically decreased the MHCII molecule expression level. Although it has been reported that *in vitro* stimulation with LPS increased MHCII<sup>+</sup> frequency and expression, it has also been described that LPS antagonizes the stimulating effect of IFN- $\gamma$  or IL-4 on MHCII molecule expression *in vitro* [31-34]. The inhibitor pathway triggered by LPS is currently unknown but could involve autocrine or paracrine secretion of IL-10 by macrophages, a cytokine known to down-regulate MHCII expression [35]. It may also explain why LPS impedes T cell mediated response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) [36]. Interestingly, the levels of MHCII molecules on the whole macrophages and the M1 subset but also on cDC2 were weaker in tPA-deficient mice exposed to LPS. This is in agreement with our previous study showing that exogenous tPA increased the level of MHCII molecules on splenic macrophages and DC in EAE mice [37].

Lin *et al* have shown that CD11b is a coreceptor of annexin A2 involved in the tPA intracellular signaling [38]. Importantly, we evidenced that LPS strongly increased the level of CD11b on MHCII<sup>+</sup> macrophages and tolerogenic CD11b<sup>low</sup> DCs but not on cDC suggesting that the Gram-endotoxin could selectively increase the sensitivity of these cell subsets to tPA. Of note, upregulation of CD11b by LPS is observed in MHCII-

macrophages from tPA<sup>-/-</sup> but not WT. It could be a negative feedback of tPA, on one of its receptors, regulating tPA activity in MHCII<sup>+</sup> macrophages in inflammatory conditions.

Although the M1/M2 polarization paradigm mainly results from *in vitro* studies, our results showed that LPS injection induced an upregulation of M1 cells *in vivo* [39,40]. However, frequency of M1 cells is decreased in tPA<sup>-/-</sup> mice, in agreement with previous studies showing that tPA promotes M1 phenotype *in vitro* and in a model of chronic renal disease *in vivo* [41]. M1 cell reduction in tPA-deficient mice may explain by the pro-survival effect of the serine protease on M1 macrophages [42]. The role of tPA in regulation of macrophages activation is nevertheless more complex since, it also maintains the expression of the M2 marker CD206 after LPS stimulation without modifying the frequency of M2 cells. Sugimoto *et al* have shown that pleural injection of PLG and plasmin increased CD206 expression on macrophages suggesting that tPA may have a pleiotropic and dynamic role in the course of inflammation acting both in the beginning and in the resolving phases of inflammation [26].

Splenic CD11c<sup>+</sup> macrophages are associated with inflammatory pathologies in organ such as lung and kidney [28,29]. In our study, this subset retains many phenotypic characteristics of MHCII<sup>+</sup> macrophages but are more prone to express CD80 and CD86 costimulatory molecules. Drutman *et al* have shown that splenic CD11c<sup>+</sup> macrophages also share close phenotypic and functional properties with activated macrophages (endocytosis and poor T cell stimulation ability) [43]. Our results also confirmed previous observation showing that LPS treatment decreases CD11c expression on myeloid cells [44]. It has been suggested that CD11c/CD18, acting as a LPS receptor, is downregulated following the binding with its ligand [45].

In our study, LPS treatment reduced the proportion of total DCs in spleen, likely by altering their migratory capacity and their dissemination in other organs, and no effect of tPA on the frequency of total cDC was noticed. These results are not in agreement with Draxler *et al* who have described that tPA induced a decrease of splenic cDC proportion 24h after its administration in mice [46]. By comparing deficient and WT mice, we did not notice an effect of tPA on the frequency of total cDC. Nevertheless, we could show that tPA modulates the proportion of cDC1 et DC2 subsets. Hancock *et al* have shown that cDC1 and cDC2 isolated from LPS-treated mice have distinct transcriptomic signatures even though they share a set of common genes induced by LPS [47]. [45]. Although the cDC subsets have redundant functions, cDC1 are specialized in CTL and Th1 responses while cDC2 are more prone to regulate T cell differentiation toward Th2 or Th17 profiles [48]. So, further investigations are required to know at which level tPA may impact the outcome of the T cell response *in vivo*.

In conclusion, our study updates the description of the effects of LPS on the mononuclear phagocyte phenotype *in vivo* and reports on its contrasted function in inflammation. On one hand, LPS increases the proportion of immunogenic macrophages expressing MHC class II and costimulatory molecules but on the other hand, it decreases the MHC II expression level and so, reduces potentially their ability to stimulate T cells in an efficient way. tPA appears as a modulator of the adaptive immune response by antagonizing LPS effect on MHCII expression, enhancing M1 profile and modifying the distribution of cDCs upon inflammation.

Figure 1

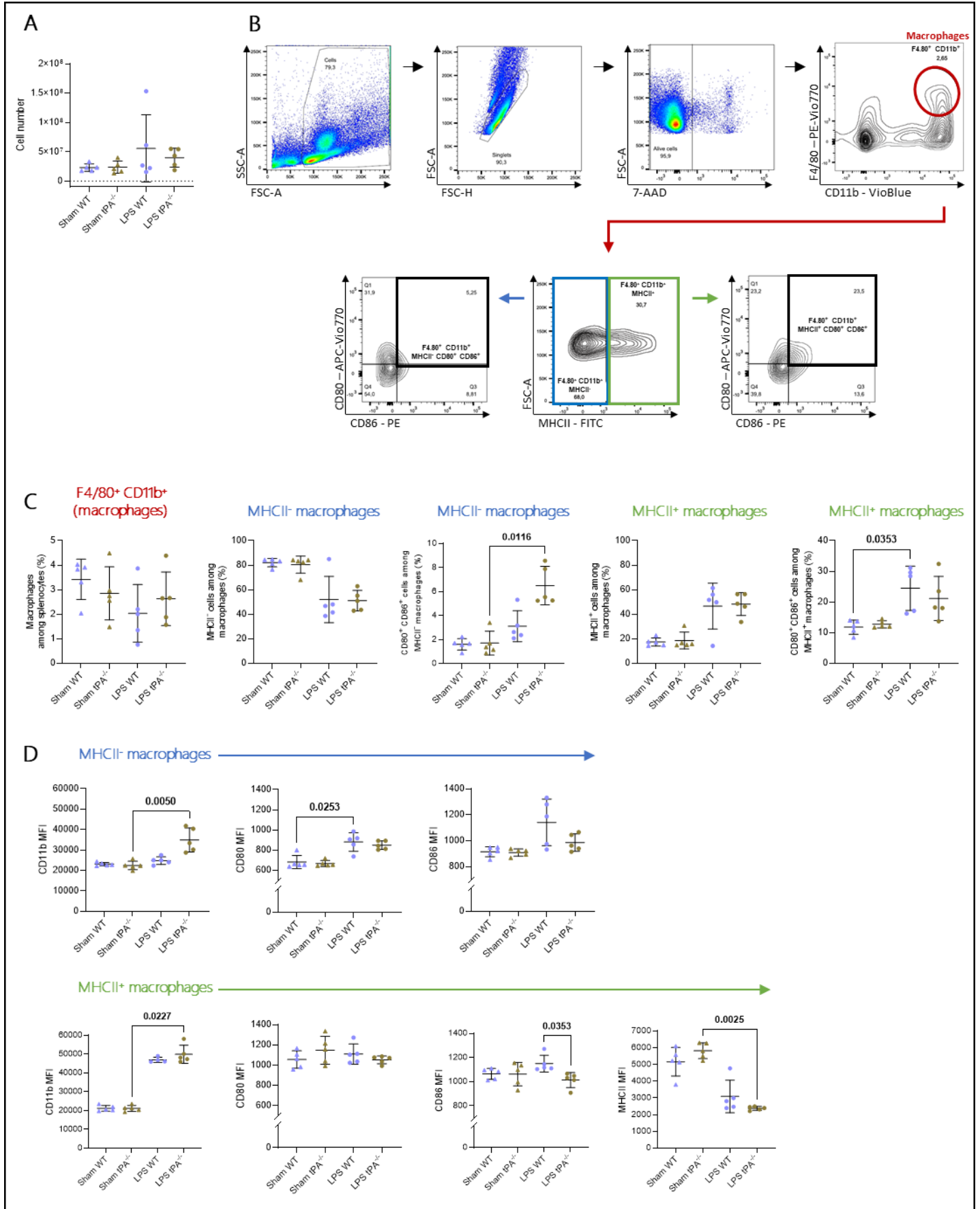


Figure 1: Effect of LPS treatment on the phenotype of splenic macrophages from tPA<sup>-/-</sup> mice. A) Quantification of total splenocytes by flow cytometry and cell counting. B) Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of macrophages (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup>), expressing MHCII molecules (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>) or not (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>-</sup>) and costimulatory molecules (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>+/-</sup> CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup>). C) Quantification of macrophage frequency, expressing MHCII molecules (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>) or not (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>-</sup>) and costimulatory molecules (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>+/-</sup> CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup>). D) Quantification of MFI of CD11b, CD80, CD86 and MHCII molecules on MHCII<sup>+/-</sup> macrophages. Data are showed as individual animals with median  $\pm$  SD, n=5, \* p<0.05, \*\* p<0.01 by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.



Figure 2

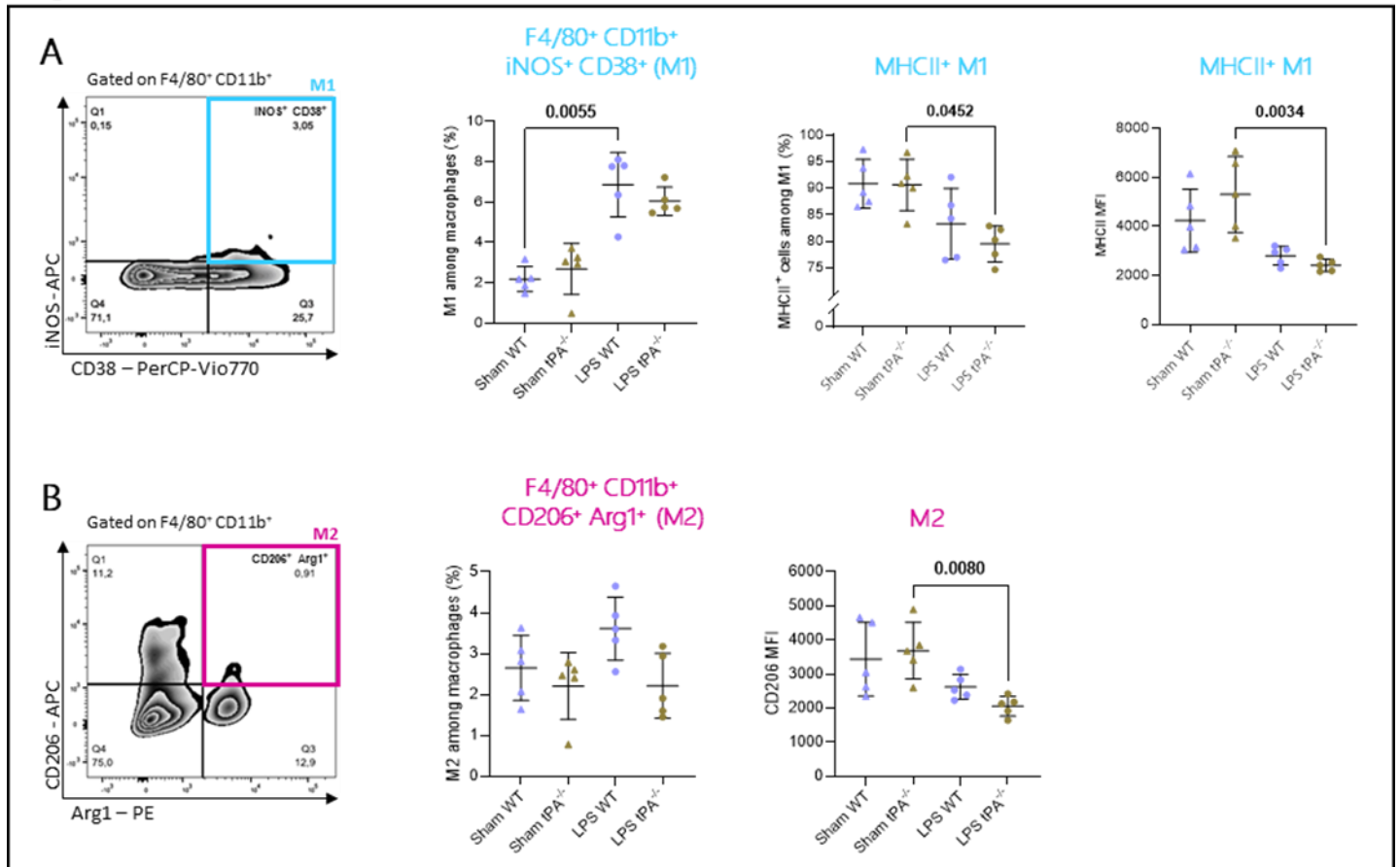




Figure 2: tPA impacts M1/M2 polarization upon inflammatory stimulation. A) Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of M1 (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> iNOS<sup>+</sup> CD38<sup>+</sup>). Quantification of M1 ± MHCII cell frequency and MFI of MHCII<sup>+</sup> on M1 cells. B) Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of M2 (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD206<sup>+</sup> Arg-1<sup>+</sup>). Quantification of M2 cell frequency and MFI of CD206<sup>+</sup> molecules on M2 cells. Data are showed as individual animals with median ± SD, n=5, \* p<0.05, \*\* p<0.01 by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.

Figure 3

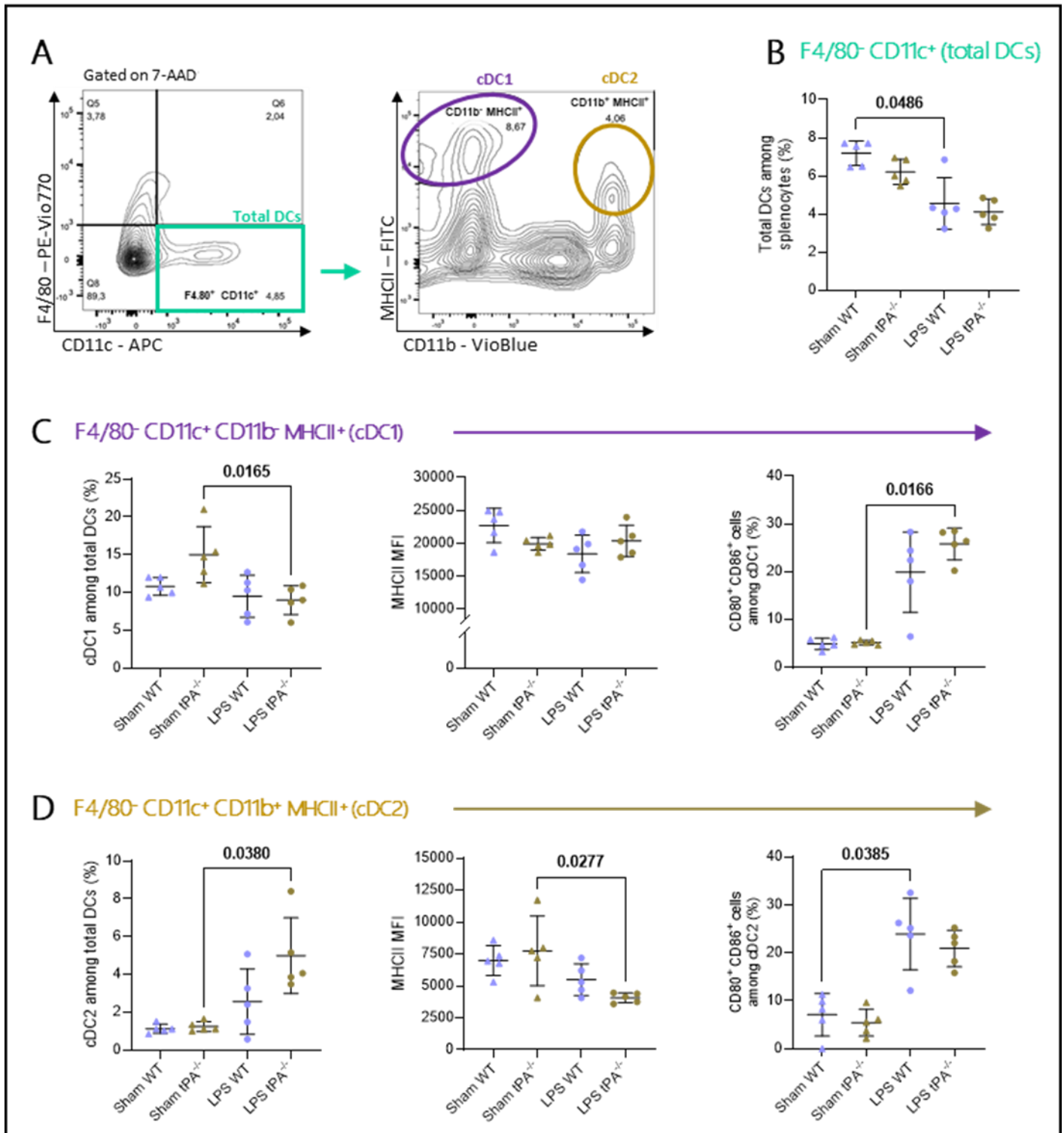


Figure 3: tPA affects cDCs repartition in inflammatory setting. A) Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of total DCs (F4/80<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup>) and cDCs: cDC1 (F4/80<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> MHCII<sup>+</sup>), cDC2 (F4/80<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>). B) Quantification of total DC frequency. C) Quantification of cDC1 frequency, MFI of MHCII molecules on cDC1, and CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> cell frequency among cDC1. D) Quantification of cDC2 frequency, MFI of MHCII on cDC1, and CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> cell frequency among cDC1. Data are showed as individual animals with median  $\pm$  SD, n=5, \* p<0.05 by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.

Figure 4

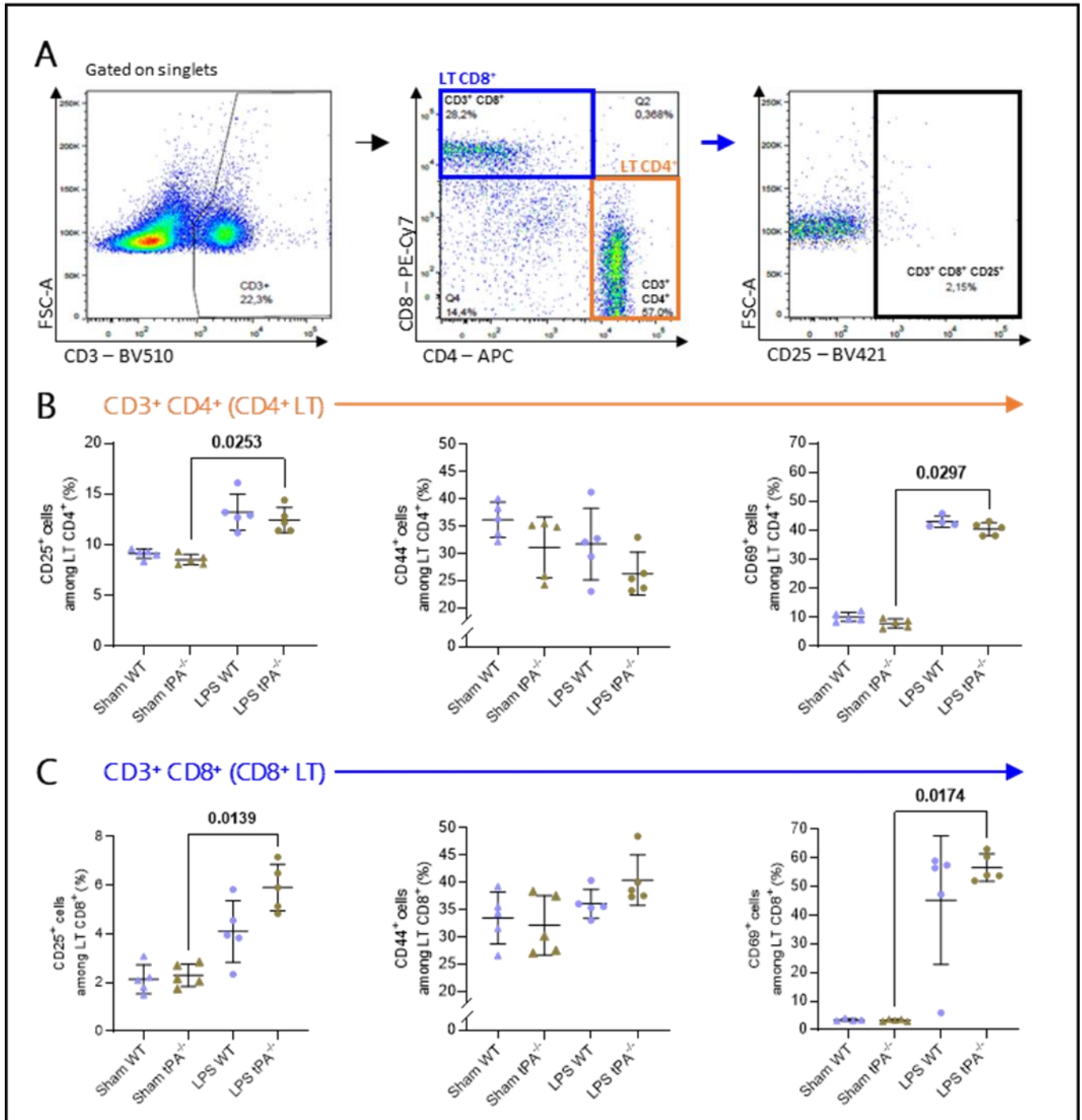
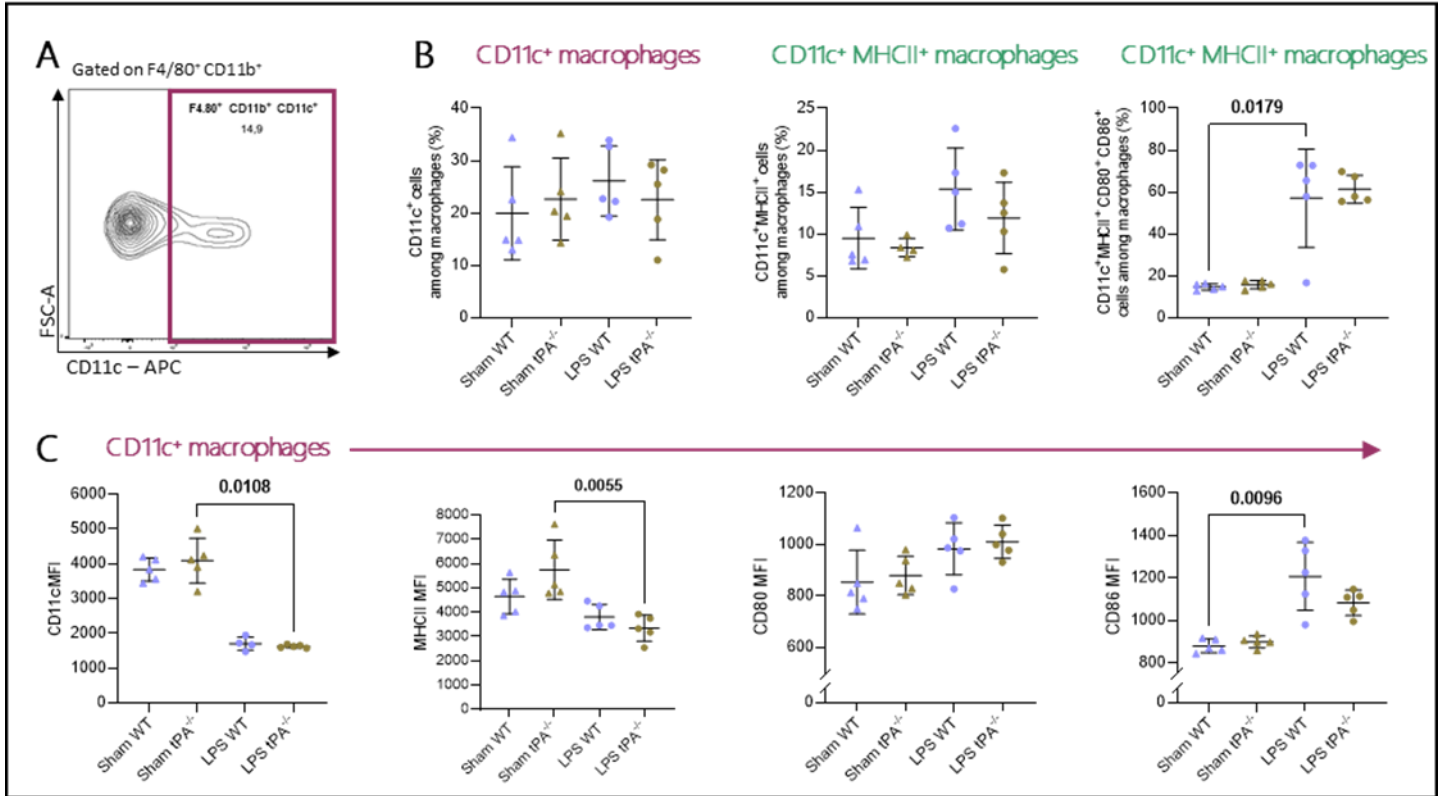


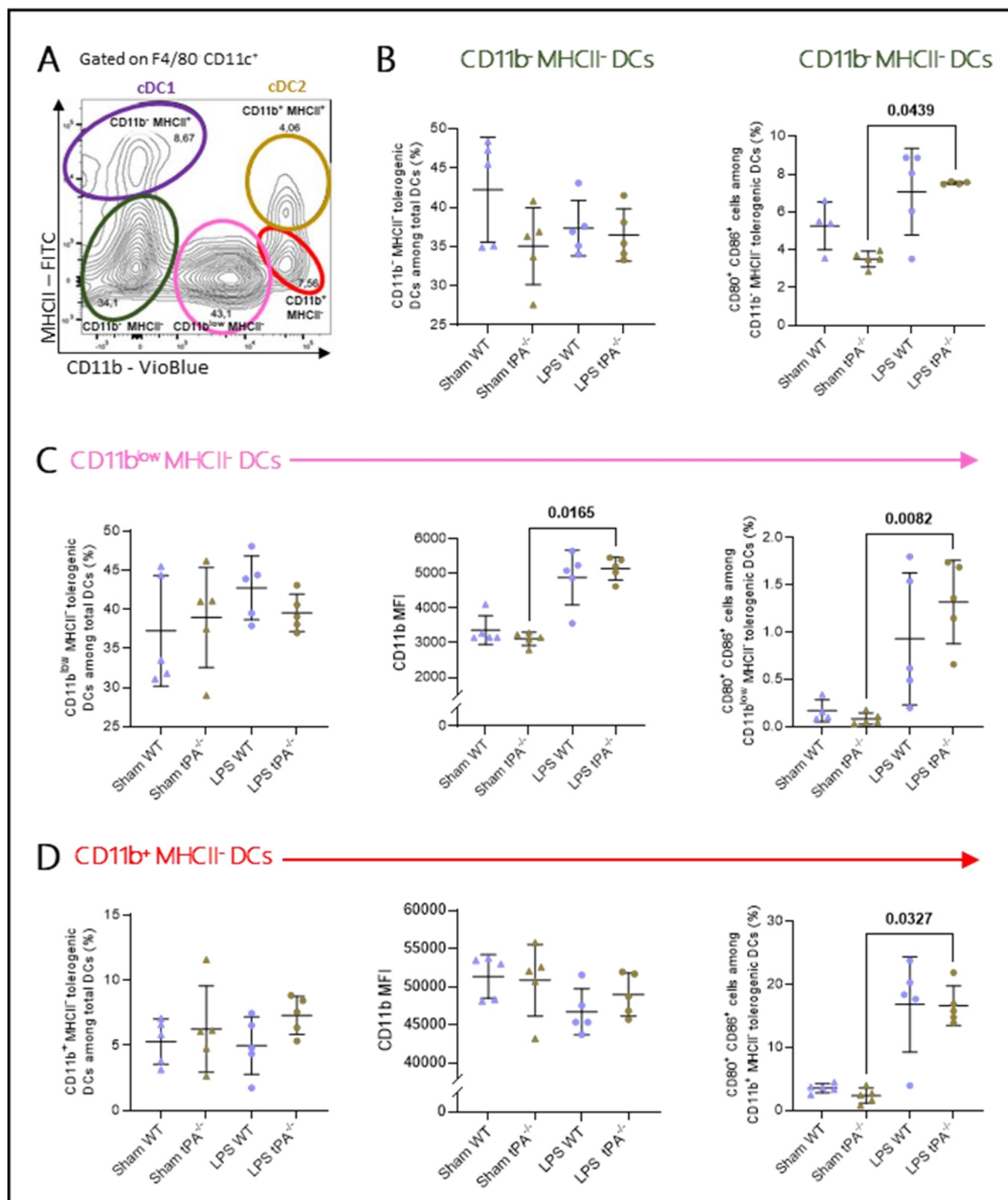
Figure 4: tPA modulates T cell activation during inflammation. A) Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of LT, CD8<sup>+</sup> LT, CD4<sup>+</sup> LT, and activated CD8<sup>+</sup> LT (CD3<sup>+</sup> CD8<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup>). B) Quantification of CD4<sup>+</sup> or C) CD8<sup>+</sup> LT expressing CD25, CD44 or CD69 activation markers. Data are showed as individual animals with median  $\pm$  SD, n=5, \* p<0.05 by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.

## Supplementary data 1



Supplementary data 1: Phenotype of CD11c macrophages subset after LPS injection in tPA<sup>-/-</sup> mice. A) Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of CD11c<sup>+</sup> macrophages (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup>). B) Quantification of CD11c<sup>+</sup> macrophage frequency, expressing MHCII molecules (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup>) and activation markers (F4/80<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> CD11c<sup>+</sup> MHCII<sup>+</sup> CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup>). C) MFI quantification of CD11c, MHCII, CD80, CD86 molecules on CD11c<sup>+</sup> macrophages. Data are showed as individual animals with median  $\pm$  SD, n=5, \* p<0.05, \*\* p<0.01 by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.

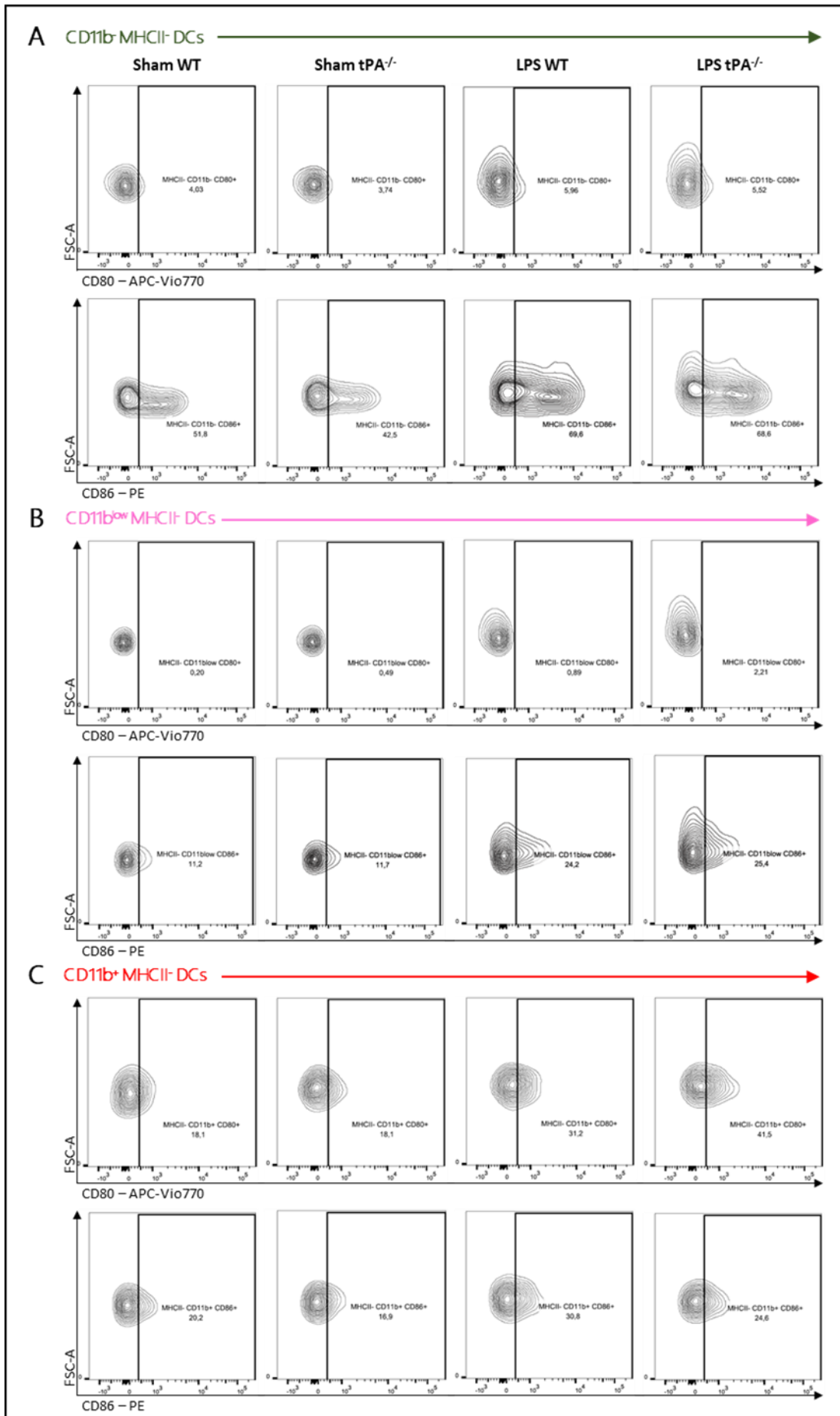
## Supplementary data 2





Supplementary data 2: Tolerogenic DC subset distribution upon inflammation in tPA<sup>-/-</sup> mice. A) Representative flow cytometry gating strategy used for quantification of three tolerogenic DC subsets (F4/80<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>-</sup> MHCII<sup>-</sup>; F4/80<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>low</sup> MHCII<sup>-</sup>; F4/80<sup>-</sup> CD11c<sup>+</sup> CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>-</sup>). B) Quantification of CD11b<sup>-</sup> MHCII<sup>-</sup> and CD11b<sup>-</sup> MHCII<sup>-</sup> CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> DC frequency. C) Quantification of CD11b<sup>low</sup> MHCII<sup>-</sup> DC frequency, MFI of CD11b on CD11b<sup>low</sup> MHCII<sup>-</sup> DCs, and CD11b<sup>low</sup> MHCII<sup>-</sup> CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> DC frequency. D) Quantification of CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>-</sup> DC frequency, MFI of CD11b on CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>-</sup> DCs, and CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>-</sup> CD80<sup>+</sup> CD86<sup>+</sup> DC frequency. Data are showed as individual animals with median  $\pm$  SD, n=5, \* p<0.05, \*\* p<0.01 by one-way ANOVA (Kruskal-Wallis) with Dunn's *post-hoc*.

## Supplementary data 3



Supplementary data 3: Costimulatory molecules level expression on tolerogenic DC subsets. Representative flow cytometry analysis used for quantification of CD80 and CD86 MFI on A) CD11b<sup>-</sup> MHCII<sup>-</sup> DCs, B) CD11b<sup>low</sup> MHCII<sup>-</sup> DCs, and C) CD11b<sup>+</sup> MHCII<sup>-</sup> DCs.

## REFERENCES

- 1 J.M. Bennett, G. Reeves, G.E. Billman, J.P. Sturmborg, Inflammation-Nature's Way to Efficiently Respond to All Types of Challenges: Implications for Understanding and Managing "the Epidemic" of Chronic Diseases, *Front Med (Lausanne)*. 5 (2018) 316. <https://doi.org/10.3389/fmed.2018.00316>.
- 2 A. Gisterå, G.K. Hansson, The immunology of atherosclerosis, *Nat Rev Nephrol*. 13 (2017) 368-380. <https://doi.org/10.1038/nrneph.2017.51>.
- 3 J.E. Greb, A.M. Goldminz, J.T. Elder, M.G. Lebowitz, D.D. Gladman, J.J. Wu, N.N. Mehta, A.Y. Finlay, A.B. Gottlieb, Psoriasis, *Nat Rev Dis Primers*. 2 (2016) 16082. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2016.82>.
- 4 R. Caruso, B.C. Lo, G. Núñez, Host-microbiota interactions in inflammatory bowel disease, *Nat Rev Immunol*. 20 (2020) 411-426. <https://doi.org/10.1038/s41577-019-0268-7>.
- 5 M. Locati, G. Curtale, A. Mantovani, Diversity, Mechanisms, and Significance of Macrophage Plasticity, *Annu Rev Pathol*. 15 (2020) 123-147. <https://doi.org/10.1146/annurev-pathmechdis-012418-012718>.
- 6 K.A. Jablonski, S.A. Amici, L.M. Webb, J. de D. Ruiz-Rosado, P.G. Popovich, S. Partida-Sanchez, M. Guerau-de-Arellano, Novel Markers to Delineate Murine M1 and M2 Macrophages, *PLoS One*. 10 (2015) e0145342. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0145342>.
- 7 S.C. Eisenbarth, Dendritic cell subsets in T cell programming: location dictates function, *Nat Rev Immunol*. 19 (2019) 89-103. <https://doi.org/10.1038/s41577-018-0088-1>.
- 8 J.M. den Haan, S.M. Lehar, M.J. Bevan, CD8(+) but not CD8(-) dendritic cells cross-prime cytotoxic T cells in vivo, *J Exp Med*. 192 (2000) 1685-1696. <https://doi.org/10.1084/jem.192.12.1685>.
- 9 C. Yamazaki, M. Sugiyama, T. Ohta, H. Hemmi, E. Hamada, I. Sasaki, Y. Fukuda, T. Yano, M. Nobuoka, T. Hirashima, A. Iizuka, K. Sato, T. Tanaka, K. Hoshino, T. Kaisho, Critical roles of a dendritic cell subset expressing a chemokine receptor, XCR1, *J Immunol*. 190 (2013) 6071-6082. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202798>.
- 10 A.E. Morelli, A.T. Larregina, W.J. Shufesky, A.F. Zahorchak, A.J. Logar, G.D. Papworth, Z. Wang, S.C. Watkins, L.D. Falo, A.W. Thomson, Internalization of circulating apoptotic cells by splenic marginal zone dendritic cells: dependence on complement receptors and effect on cytokine production, *Blood*. 101 (2003) 611-620. <https://doi.org/10.1182/blood-2002-06-1769>.
- 11 C.A. Iberg, D. Hawiger, Natural and Induced Tolerogenic Dendritic Cells, *J Immunol*. 204 (2020) 733-744. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1901121>.
- 12 E. Marín, M.C. Cuturi, A. Moreau, Tolerogenic Dendritic Cells in Solid Organ Transplantation: Where Do We Stand?, *Front Immunol*. 9 (2018) 274. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00274>.
- 13 S.M. Opal, Phylogenetic and functional relationships between coagulation and the innate immune response, *Crit Care Med*. 28 (2000) S77-80. <https://doi.org/10.1097/00003246-200009001-00017>.
- 14 M. Levi, T. van der Poll, Two-way interactions between inflammation and coagulation, *Trends Cardiovasc Med*. 15 (2005) 254-259. <https://doi.org/10.1016/j.tcm.2005.07.004>.
- 15 E.G. Sozmen, K. Akassoglou, Coagulation and immunity: Caught in the fibrin web, *Immunity*. 54 (2021) 2439-2441. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.10.016>.

- 16 L. Lin, K. Hu, Tissue plasminogen activator and inflammation: from phenotype to signaling mechanisms, *Am J Clin Exp Immunol.* 3 (2014) 30-36.
- 17 B. Heissig, Y. Salama, S. Takahashi, T. Osada, K. Hattori, The multifaceted role of plasminogen in inflammation, *Cell Signal.* 75 (2020) 109761. <https://doi.org/10.1016/j.cellsig.2020.109761>.
- 18 C. Seillier, P. Hélie, G. Petit, D. Vivien, D. Clemente, B. Le Mauff, F. Docagne, O. Toutirais, Roles of the tissue-type plasminogen activator in immune response, *Cell Immunol.* 371 (2021) 104451. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104451>.
- 19 A.M. Thiebaut, M. Gauberti, C. Ali, S. Martinez De Lizarrondo, D. Vivien, M. Yepes, B.D. Roussel, The role of plasminogen activators in stroke treatment: fibrinolysis and beyond, *Lancet Neurol.* 17 (2018) 1121-1132. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(18\)30323-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(18)30323-5).
- 20 J.R. Ward, S.K. Dower, M.K.B. Whyte, D.J. Buttle, I. Sabroe, Potentiation of TLR4 signalling by plasmin activity, *Biochem Biophys Res Commun.* 341 (2006) 299-303. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2005.12.188>.
- 21 T. Syrovets, M. Jendrach, A. Rohwedder, A. Schüle, T. Simmet, Plasmin-induced expression of cytokines and tissue factor in human monocytes involves AP-1 and IKKbeta-mediated NF-kappaB activation, *Blood.* 97 (2001) 3941-3950. <https://doi.org/10.1182/blood.v97.12.3941>.
- 22 C. Zalfa, P. Azmoon, E. Mantuano, S.L. Gonias, Tissue-type plasminogen activator neutralizes LPS but not protease-activated receptor-mediated inflammatory responses to plasmin, *J Leukoc Biol.* 105 (2019) 729-740. <https://doi.org/10.1002/JLB.3A0818-329RRR>.
- 23 E. Mantuano, P. Azmoon, C. Brifault, M.A. Banki, A.S. Gilder, W.M. Campana, S.L. Gonias, Tissue-type plasminogen activator regulates macrophage activation and innate immunity, *Blood.* 130 (2017) 1364-1374. <https://doi.org/10.1182/blood-2017-04-780205>.
- 24 R. Renckens, J.J.T.H. Roelofs, S. Florquin, A.F. de Vos, J.M. Pater, H.R. Lijnen, P. Carmeliet, C. van 't Veer, T. van der Poll, Endogenous tissue-type plasminogen activator is protective during Escherichia coli-induced abdominal sepsis in mice, *J Immunol.* 177 (2006) 1189-1196. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.177.2.1189>.
- 25 Y. Guo, J. Li, E. Hagström, T. Ny, Beneficial and detrimental effects of plasmin(ogen) during infection and sepsis in mice, *PLoS One.* 6 (2011) e24774. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0024774>.
- 26 M.A. Sugimoto, A.L.C. Ribeiro, B.R.C. Costa, J.P. Vago, K.M. Lima, F.S. Carneiro, M.M.O. Ortiz, G.L.N. Lima, A.A.F. Carmo, R.M. Rocha, D.A. Perez, A.C. Reis, V. Pinho, L.A. Miles, C.C. Garcia, M.M. Teixeira, L.P. Sousa, Plasmin and plasminogen induce macrophage reprogramming and regulate key steps of inflammation resolution via annexin A1, *Blood.* 129 (2017) 2896-2907. <https://doi.org/10.1182/blood-2016-09-742825>.
- 27 R.J. Borg, A.L. Samson, A.E.-L. Au, A. Scholzen, M. Fuchsberger, Y.Y. Kong, R. Freeman, N.A. Mifsud, M. Plebanski, R.L. Medcalf, Dendritic Cell-Mediated Phagocytosis but Not Immune Activation Is Enhanced by Plasmin, *PLoS One.* 10 (2015) e0131216. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131216>.
- 28 Q. Cao, Y. Wang, X.M. Wang, J. Lu, V.W.S. Lee, Q. Ye, H. Nguyen, G. Zheng, Y. Zhao, S.I. Alexander, D.C.H. Harris, Renal F4/80+ CD11c+ mononuclear phagocytes display phenotypic and functional characteristics of macrophages in



- health and in adriamycin nephropathy, *J Am Soc Nephrol*. 26 (2015) 349-363. <https://doi.org/10.1681/ASN.2013121336>.
- 29 M. Bosmann, J.J. Grailer, N.F. Russkamp, R. Ruemmler, F.S. Zetoune, J.V. Sarma, P.A. Ward, CD11c+ alveolar macrophages are a source of IL-23 during lipopolysaccharide-induced acute lung injury, *Shock*. 39 (2013) 447-452. <https://doi.org/10.1097/SHK.0b013e31828f9c92>.
- 30 X. Li, T. Syrovets, F. Genze, K. Pitterle, A. Oberhuber, K.-H. Orend, T. Simmet, Plasmin triggers chemotaxis of monocyte-derived dendritic cells through an Akt2-dependent pathway and promotes a T-helper type-1 response, *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. 30 (2010) 582-590. <https://doi.org/10.1161/ATVBAHA.109.202044>.
- 31 G. Liu, X.-P. Xia, S.-L. Gong, Y. Zhao, The macrophage heterogeneity: difference between mouse peritoneal exudate and splenic F4/80+ macrophages, *J Cell Physiol*. 209 (2006) 341-352. <https://doi.org/10.1002/jcp.20732>.
- 32 P.H. Hart, D.R. Burgess, G.F. Vitti, J.A. Hamilton, Interleukin-4 stimulates human monocytes to produce tissue-type plasminogen activator, *Blood*. 74 (1989) 1222-1225.
- 33 P.S. Steeg, H.M. Johnson, J.J. Oppenheim, Regulation of murine macrophage Ia antigen expression by an immune interferon-like lymphokine: inhibitory effect of endotoxin, *J Immunol*. 129 (1982) 2402-2406.
- 34 T.J. Koerner, T.A. Hamilton, D.O. Adams, Suppressed expression of surface Ia on macrophages by lipopolysaccharide: evidence for regulation at the level of accumulation of mRNA, *J Immunol*. 139 (1987) 239-243.
- 35 R.A. Pengal, L.P. Ganesan, G. Wei, H. Fang, M.C. Ostrowski, S. Tridandapani, Lipopolysaccharide-induced production of interleukin-10 is promoted by the serine/threonine kinase Akt, *Mol Immunol*. 43 (2006) 1557-1564. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2005.09.022>.
- 36 S. Raziuddin, R.F. Kibler, D.C. Morrison, Prevention of experimental allergic encephalomyelitis by bacterial lipopolysaccharides: inhibition of cell-mediated immunity, *J Immunol*. 127 (1981) 13-16.
- 37 P. Hélie, C. Camacho-Toledano, L. Leseq, C. Seillier, A.J. Miralles, M.C. Ortega, S. Guérit, H. Lebas, I. Bardou, V. Vila-Del Sol, D. Vivien, B. Le Mauff, D. Clemente, F. Docagne, O. Toutirais, Tissue plasminogen activator worsens experimental autoimmune encephalomyelitis by complementary actions on lymphoid and myeloid cell responses, *J Neuroinflammation*. 18 (2021) 52. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02102-5>.
- 38 L. Lin, C. Wu, K. Hu, Tissue plasminogen activator activates NF- $\kappa$ B through a pathway involving annexin A2/CD11b and integrin-linked kinase, *J Am Soc Nephrol*. 23 (2012) 1329-1338. <https://doi.org/10.1681/ASN.2011111123>.
- 39 F.O. Martinez, S. Gordon, The M1 and M2 paradigm of macrophage activation: time for reassessment, *F1000Prime Rep*. 6 (2014) 13. <https://doi.org/10.12703/P6-13>.
- 40 M. Nahrendorf, F.K. Swirski, Abandoning M1/M2 for a Network Model of Macrophage Function, *Circ Res*. 119 (2016) 414-417. <https://doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309194>.
- 41 L. Lin, K. Hu, Tissue-type plasminogen activator modulates macrophage M2 to M1 phenotypic change through annexin A2-mediated NF- $\kappa$ B pathway, *Oncotarget*. 8 (2017) 88094-88103. <https://doi.org/10.18632/oncotarget.21510>.
- 42 L. Lin, Y. Jin, K. Hu, Tissue-type plasminogen activator (tPA) promotes M1 macrophage survival through p90 ribosomal S6 kinase (RSK) and p38 mitogen-

- activated protein kinase (MAPK) pathway, *J Biol Chem.* 290 (2015) 7910-7917. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.599688>.
- 43 S.B. Drutman, J.C. Kendall, E.S. Trombetta, Inflammatory spleen monocytes can upregulate CD11c expression without converting into dendritic cells, *J Immunol.* 188 (2012) 3603-3610. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1102741>.
- 44 K.L. Griffiths, J.K.H. Tan, H.C. O'Neill, Characterization of the effect of LPS on dendritic cell subset discrimination in spleen, *J Cell Mol Med.* 18 (2014) 1908-1912. <https://doi.org/10.1111/jcmm.12332>.
- 45 R.R. Ingalls, D.T. Golenbock, CD11c/CD18, a transmembrane signaling receptor for lipopolysaccharide, *J Exp Med.* 181 (1995) 1473-1479. <https://doi.org/10.1084/jem.181.4.1473>.
- 46 D.F. Draxler, F. Lee, H. Ho, C.B. Keragala, R.L. Medcalf, B. Niego, t-PA Suppresses the Immune Response and Aggravates Neurological Deficit in a Murine Model of Ischemic Stroke, *Front Immunol.* 10 (2019) 591. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00591>.
- 47 D.G. Hancock, E. Shklovskaya, T.V. Guy, R. Falsafi, C.D. Fjell, W. Ritchie, R.E.W. Hancock, B. Fazekas de St Groth, A systems biology approach to the analysis of subset-specific responses to lipopolysaccharide in dendritic cells, *PLoS One.* 9 (2014) e100613. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0100613>.
- [48] V. Durai, K.M. Murphy, Functions of Murine Dendritic Cells, *Immunity.* 45 (2016) 719-736. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2016.10.010>.

## BIBLIOGRAPHIE





## Bibliographie

- Abbas, Abul K., Andrew H. Lichtman, Shiv Pillai, et Pierre L. Masson. 2016. *Les bases de l'immunologie fondamentale et clinique*. Campus référence. Issy-les-Moulineaux: Elsevier Masson.
- Adnet, Thomas, Anne-Claire Groo, Céline Picard, Audrey Davis, Sophie Corvaisier, Marc Since, Frédéric Bounoure, et al. 2020. « Pharmacotechnical Development of a Nasal Drug Delivery Composite Nanosystem Intended for Alzheimer's Disease Treatment ». *Pharmaceutics* 12 (3): 251. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics12030251>.
- Ahlmann, Martina, et Georg Hempel. 2016. « The Effect of Cyclophosphamide on the Immune System: Implications for Clinical Cancer Therapy ». *Cancer Chemotherapy and Pharmacology* 78 (4): 661-71. <https://doi.org/10.1007/s00280-016-3152-1>.
- Ahmad, Suhana, Mohammad A.I. Al-Hatamleh, et Rohimah Mohamud. 2021. « Targeting Immunosuppressor Cells with Nanoparticles in Autoimmunity: How Far Have We Come To? ». *Cellular Immunology* 368 (octobre): 104412. <https://doi.org/10.1016/j.cellimm.2021.104412>.
- Ahmed Hamed Khalil, Islam, Islam A. Arida, et Mohamed Ahmed. 2020. « Introductory Chapter: Overview on Nanomedicine Market ». In *Current and Future Aspects of Nanomedicine*, édité par Islam Ahmed Hamed Khalil. IntechOpen. <https://doi.org/10.5772/intechopen.91890>.
- Alves de Lima, Kalil, Justin Rustenhoven, Sandro Da Mesquita, Morgan Wall, Andrea Francesca Salvador, Igor Smirnov, Guilherme Martelossi Cebinelli, et al. 2020. « Meningeal  $\gamma\delta$  T Cells Regulate Anxiety-like Behavior via IL-17a Signaling in Neurons ». *Nature Immunology* 21 (11): 1421-29. <https://doi.org/10.1038/s41590-020-0776-4>.
- Andrieux, Karine, et Patrick Couvreur. 2012. « Nanoparticules pour la délivrance cérébrale de principes actifs ou d'agents de contraste. Application à la maladie d'Alzheimer ». *Biologie Aujourd'hui* 206 (3): 185-90. <https://doi.org/10.1051/jbio/2012019>.
- Ardavin, Carlos, et Ken Shortman. 1992. « Cell Surface Marker Analysis of Mouse Thymic Dendritic Cells ». *European Journal of Immunology* 22 (3): 859-62. <https://doi.org/10.1002/eji.1830220334>.
- Arinuma, Yoshiyuki, Tamiko Yanagida, et Shunsei Hirohata. 2008. « Association of Cerebrospinal Fluid Anti-NR2 Glutamate Receptor Antibodies with Diffuse Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus ». *Arthritis & Rheumatism* 58 (4): 1130-35. <https://doi.org/10.1002/art.23399>.
- Babaei, Parvin. 2021. « NMDA and AMPA Receptors Dysregulation in Alzheimer's Disease ». *European Journal of Pharmacology* 908 (octobre): 174310. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2021.174310>.
- Barry, Daniel N., et Eleanor A. Maguire. 2019. « Remote Memory and the Hippocampus: A Constructive Critique ». *Trends in Cognitive Sciences* 23 (2): 128-42. <https://doi.org/10.1016/j.tics.2018.11.005>.

- Bejan-Angoulvant, Theodora, et Joachim Alexandre. 2019. « Mécanismes d'action et toxicités potentielles des anticorps monoclonaux ». *médecine/sciences* 35 (12): 1114-20. <https://doi.org/10.1051/medsci/2019208>.
- Bell, G M, A E Anderson, J Diboll, R Reece, O Eltherington, R A Harry, T Fouweather, et al. 2017. « Autologous Tolerogenic Dendritic Cells for Rheumatoid and Inflammatory Arthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 76 (1): 227-34. <https://doi.org/10.1136/annrheumdis-2015-208456>.
- Bennett, Craig L., Jacinda Christie, Fred Ramsdell, Mary E. Brunkow, Polly J. Ferguson, Luke Whitesell, Thaddeus E. Kelly, Frank T. Saulsbury, Phillip F. Chance, et Hans D. Ochs. 2001. « The Immune Dysregulation, Polyendocrinopathy, Enteropathy, X-Linked Syndrome (IPEX) Is Caused by Mutations of FOXP3 ». *Nature Genetics* 27 (1): 20-21. <https://doi.org/10.1038/83713>.
- Benson, J. M., S. S. Stuckman, K. L. Cox, R. M. Wardrop, I. E. Gienapp, A. H. Cross, J. L. Trotter, et C. C. Whitacre. 1999. « Oral Administration of Myelin Basic Protein Is Superior to Myelin in Suppressing Established Relapsing Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 162 (10): 6247-54.
- Bettini, Maria, Kristen Rosenthal, et Brian D. Evavold. 2009. « Pathogenic MOG-Reactive CD8+ T Cells Require MOG-Reactive CD4+ T Cells for Sustained CNS Inflammation during Chronic EAE ». *Journal of Neuroimmunology* 213 (1-2): 60-68. <https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2009.05.017>.
- Bitanhirwe, Bky, Mp Lim, Jf Kelley, T Kaneko, et Tuw Woo. 2009. « Glutamatergic Deficits and Parvalbumin-Containing Inhibitory Neurons in the Prefrontal Cortex in Schizophrenia ». *BMC Psychiatry* 9 (1): 71. <https://doi.org/10.1186/1471-244X-9-71>.
- Bluestone, Jeffrey A., et Qizhi Tang. 2004. « Therapeutic Vaccination Using CD4 + CD25 + Antigen-Specific Regulatory T Cells ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 101 (suppl\_2): 14622-26. <https://doi.org/10.1073/pnas.0405234101>.
- Boldison, Joanne, et F. Susan Wong. 2016. « Immune and Pancreatic  $\beta$  Cell Interactions in Type 1 Diabetes ». *Trends in Endocrinology & Metabolism* 27 (12): 856-67. <https://doi.org/10.1016/j.tem.2016.08.007>.
- Cappellano, Giuseppe, Cristoforo Comi, Annalisa Chiocchetti, et Umberto Dianzani. 2019. « Exploiting PLGA-Based Biocompatible Nanoparticles for Next-Generation Tolerogenic Vaccines against Autoimmune Disease ». *International Journal of Molecular Sciences* 20 (1): 204. <https://doi.org/10.3390/ijms20010204>.
- Carambia, Antonella, Barbara Freund, Dorothee Schwinge, Oliver T. Bruns, Sunhild C. Salmen, Harald Ittrich, Rudolph Reimer, et al. 2015. « Nanoparticle-Based Autoantigen Delivery to Treg-Inducing Liver Sinusoidal Endothelial Cells Enables Control of Autoimmunity in Mice ». *Journal of Hepatology* 62 (6): 1349-56. <https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.01.006>.
- Carrio, Roberto, Oliver F. Bathe, et Thomas R. Malek. 2004. « Initial Antigen Encounter Programs CD8 + T Cells Competent to Develop into Memory Cells That Are Activated in an Antigen-Free, IL-7- and IL-15-Rich Environment ». *The Journal*

- of *Immunology* 172 (12): 7315-23.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.172.12.7315>.
- Casey, Liam M., Kevin R. Hughes, Michael N. Saunders, Stephen D. Miller, Ryan M. Pearson, et Lonnie D. Shea. 2022. « Mechanistic Contributions of Kupffer Cells and Liver Sinusoidal Endothelial Cells in Nanoparticle-Induced Antigen-Specific Immune Tolerance ». *Biomaterials* 283 (avril): 121457.  
<https://doi.org/10.1016/j.biomaterials.2022.121457>.
- Chatha, B.T., V Bernard, P Streit, et J.P Bolam. 2000. « Synaptic Localization of Ionotropic Glutamate Receptors in the Rat Substantia Nigra ». *Neuroscience* 101 (4): 1037-51. [https://doi.org/10.1016/S0306-4522\(00\)00432-2](https://doi.org/10.1016/S0306-4522(00)00432-2).
- Chavan, Y.R., S.M. Tambe, D.D. Jain, S.V. Khairnar, et P.D. Amin. 2022. « Redefining the Importance of Polylactide-Co-Glycolide Acid (PLGA) in Drug Delivery ». *Annales Pharmaceutiques Françaises* 80 (5): 603-16.  
<https://doi.org/10.1016/j.pharma.2021.11.009>.
- Chen, Xiaohui, Fan Jia, Yue Huang, Qiao Jin, et Jian Ji. 2022. « Cancer-Associated Fibroblast-Targeted Delivery of Captopril to Overcome Penetration Obstacles for Enhanced Pancreatic Cancer Therapy ». *ACS Applied Bio Materials* 5 (7): 3544-53. <https://doi.org/10.1021/acsabm.2c00486>.
- Choi, Sung R., Owain W. Howell, Daniele Carassiti, Roberta Magliozzi, Djordje Gveric, Paolo A. Muraro, Richard Nicholas, Federico Roncaroli, et Richard Reynolds. 2012. « Meningeal Inflammation Plays a Role in the Pathology of Primary Progressive Multiple Sclerosis ». *Brain* 135 (10): 2925-37.  
<https://doi.org/10.1093/brain/aws189>.
- Ciocca, Michela, Salvatore Zaffina, Ane Fernandez Salinas, Chiara Bocci, Patrizia Palomba, Maria Giulia Conti, Sara Terreri, et al. 2021. « Evolution of Human Memory B Cells From Childhood to Old Age ». *Frontiers in Immunology* 12 (juillet): 690534. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.690534>.
- Clark, Rachael A., Benjamin Chong, Nina Mirchandani, Nooshin K. Brinster, Kei-Ichi Yamanaka, Rebecca K. Dowgiert, et Thomas S. Kupper. 2006. « The Vast Majority of CLA+ T Cells Are Resident in Normal Skin ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 176 (7): 4431-39.  
<https://doi.org/10.4049/jimmunol.176.7.4431>.
- Clemente-Casares, Xavier, Jesus Blanco, Poornima Ambalavanan, Jun Yamanouchi, Santiswarup Singha, Cesar Fandos, Sue Tsai, et al. 2016. « Expanding Antigen-Specific Regulatory Networks to Treat Autoimmunity ». *Nature* 530 (7591): 434-40. <https://doi.org/10.1038/nature16962>.
- Coles, Jonathan A., Elmarie Myburgh, James M. Brewer, et Paul G. McMenamin. 2017. « Where Are We? The Anatomy of the Murine Cortical Meninges Revisited for Intravital Imaging, Immunology, and Clearance of Waste from the Brain ». *Progress in Neurobiology* 156 (septembre): 107-48.  
<https://doi.org/10.1016/j.pneurobio.2017.05.002>.
- Cotman, C W, et D T Monaghan. 1988. « Excitatory Amino Acid Neurotransmission: NMDA Receptors and Hebb-Type Synaptic Plasticity ». *Annual Review of Neuroscience* 11 (1): 61-80.  
<https://doi.org/10.1146/annurev.ne.11.030188.000425>.

- Cross, Anne H., et Cedric S. Raine. 1990. « Serial Adoptive Transfer of Murine Experimental Allergic Encephalomyelitis: Successful Transfer Is Dependent on Active Disease in the Donor ». *Journal of Neuroimmunology* 28 (1): 27-37. [https://doi.org/10.1016/0165-5728\(90\)90038-O](https://doi.org/10.1016/0165-5728(90)90038-O).
- Dalmau, Josep. 2016. « NMDA Receptor Encephalitis and Other Antibody-Mediated Disorders of the Synapse: The 2016 Cotzias Lecture ». *Neurology* 87 (23): 2471-82. <https://doi.org/10.1212/WNL.0000000000003414>.
- Dalmau, Josep, Thais Armangué, Jesús Planagumà, Marija Radosevic, Francesco Mannara, Frank Leypoldt, Christian Geis, et al. 2019. « An Update on Anti-NMDA Receptor Encephalitis for Neurologists and Psychiatrists: Mechanisms and Models ». *The Lancet Neurology* 18 (11): 1045-57. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(19\)30244-3](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(19)30244-3).
- Dalmau, Josep, Christian Geis, et Francesc Graus. 2017. « Autoantibodies to Synaptic Receptors and Neuronal Cell Surface Proteins in Autoimmune Diseases of the Central Nervous System ». *Physiological Reviews* 97 (2): 839-87. <https://doi.org/10.1152/physrev.00010.2016>.
- Dalmau, Josep, Amy J Gleichman, Ethan G Hughes, Jeffrey E Rossi, Xiaoyu Peng, Meizan Lai, Scott K Dessain, Myrna R Rosenfeld, Rita Balice-Gordon, et David R Lynch. 2008. « Anti-NMDA-Receptor Encephalitis: Case Series and Analysis of the Effects of Antibodies ». *The Lancet Neurology* 7 (12): 1091-98. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(08\)70224-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(08)70224-2).
- Dalmau, Josep, Eric Lancaster, Eugenia Martinez-Hernandez, Myrna R Rosenfeld, et Rita Balice-Gordon. 2011. « Clinical Experience and Laboratory Investigations in Patients with Anti-NMDAR Encephalitis ». *The Lancet Neurology* 10 (1): 63-74. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(10\)70253-2](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(10)70253-2).
- Dalmau, Josep, Erdem Tüzün, Haiyan Wu, Jaime Masjuan, Jeffrey E. Rossi, Alfredo Voloschin, Joachim M. Baehring, et al. 2007. « Paraneoplastic Anti-N-methyl-D-aspartate Receptor Encephalitis Associated with Ovarian Teratoma ». *Annals of neurology* 61 (1): 25-36. <https://doi.org/10.1002/ana.21050>.
- Dalva, Matthew B, Mari A Takasu, Michael Z Lin, Steven M Shamah, Linda Hu, Nicholas W Gale, et Michael E Greenberg. 2000. « EphB Receptors Interact with NMDA Receptors and Regulate Excitatory Synapse Formation ». *Cell* 103 (6): 945-56. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00197-5](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00197-5).
- Dao, Le-Minh, Marie-Luise Machule, Petra Bacher, Julius Hoffmann, Lam-Thanh Ly, Florian Wegner, Alexander Scheffold, et Harald Prüss. 2021. « Decreased Inflammatory Cytokine Production of Antigen-Specific CD4+ T Cells in NMDA Receptor Encephalitis ». *Journal of Neurology* 268 (6): 2123-31. <https://doi.org/10.1007/s00415-020-10371-y>.
- DeGiorgio, Lorraine A., Konstantin N. Konstantinov, Sunhee C. Lee, John A. Hardin, Bruce T. Volpe, et Betty Diamond. 2001. « A Subset of Lupus Anti-DNA Antibodies Cross-React with the NR2 Glutamate Receptor in Systemic Lupus Erythematosus ». *Nature Medicine* 7 (11): 1189-93. <https://doi.org/10.1038/nm1101-1189>.
- Dendrou, Calliope A., Lars Fugger, et Manuel A. Friese. 2015. « Immunopathology of Multiple Sclerosis ». *Nature Reviews Immunology* 15 (9): 545-58. <https://doi.org/10.1038/nri3871>.



- Derbinski, Jens, Antje Schulte, Bruno Kyewski, et Ludger Klein. 2001. « Promiscuous Gene Expression in Medullary Thymic Epithelial Cells Mirrors the Peripheral Self ». *Nature Immunology* 2 (11): 1032-39. <https://doi.org/10.1038/ni723>.
- Ding, Yuewen, Zheyue Zhou, Jinyu Chen, Yu Peng, Haitao Wang, Wei Qiu, Wei Xie, Jun Zhang, et Honghao Wang. 2021. « Anti-NMDAR Encephalitis Induced in Mice by Active Immunization with a Peptide from the Amino-Terminal Domain of the GluN1 Subunit ». *Journal of Neuroinflammation* 18 (1): 53. <https://doi.org/10.1186/s12974-021-02107-0>.
- Dinoto, Alessandro, Sergio Ferrari, et Sara Mariotto. 2022. « Treatment Options in Refractory Autoimmune Encephalitis ». *CNS Drugs*, août. <https://doi.org/10.1007/s40263-022-00943-z>.
- Dong, Chen. 2021. « Cytokine Regulation and Function in T Cells ». *Annual Review of Immunology* 39 (1): 51-76. <https://doi.org/10.1146/annurev-immunol-061020-053702>.
- Du, Jie, Xiao-Hui Li, et Yuan-Jian Li. 2016. « Glutamate in Peripheral Organs: Biology and Pharmacology ». *European Journal of Pharmacology* 784 (août): 42-48. <https://doi.org/10.1016/j.ejphar.2016.05.009>.
- Duan, Tianjiao, et Alan S. Verkman. 2020. « Experimental Animal Models of Aquaporin-4-IgG-seropositive Neuromyelitis Optica Spectrum Disorders: Progress and Shortcomings ». *Brain Pathology* 30 (1): 13-25. <https://doi.org/10.1111/bpa.12793>.
- Engelhardt, Britta, et Richard M. Ransohoff. 2012. « Capture, Crawl, Cross: The T Cell Code to Breach the Blood–Brain Barriers ». *Trends in Immunology* 33 (12): 579-89. <https://doi.org/10.1016/j.it.2012.07.004>.
- Engelhardt, Britta, Peter Vajkoczy, et Roy O Weller. 2017. « The Movers and Shapers in Immune Privilege of the CNS ». *Nature Immunology* 18 (2): 123-31. <https://doi.org/10.1038/ni.3666>.
- Freitag, Tobias L., Joseph R. Podojil, Ryan M. Pearson, Frank J. Fokta, Cecilia Sahl, Marcel Messing, Leif C. Andersson, et al. 2020. « Gliadin Nanoparticles Induce Immune Tolerance to Gliadin in Mouse Models of Celiac Disease ». *Gastroenterology* 158 (6): 1667-1681.e12. <https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.01.045>.
- Gable, M. S., S. Gavali, A. Radner, D. H. Tilley, B. Lee, L. Dyner, A. Collins, A. Dengel, J. Dalmau, et C. A. Glaser. 2009. « Anti-NMDA Receptor Encephalitis: Report of Ten Cases and Comparison with Viral Encephalitis ». *European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases* 28 (12): 1421-29. <https://doi.org/10.1007/s10096-009-0799-0>.
- Gauberti, Maxime, Axel Montagne, Oscar A. Marcos-Contreras, Audrey Le Béhot, Eric Maubert, et Denis Vivien. 2013. « Ultra-Sensitive Molecular MRI of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Reveals a Dynamic Inflammatory Penumbra After Strokes ». *Stroke* 44 (7): 1988-96. <https://doi.org/10.1161/STROKEAHA.111.000544>.
- Gaublomme, Jellert T., Nir Yosef, Youjin Lee, Rona S. Gertner, Li V. Yang, Chuan Wu, Pier Paolo Pandolfi, et al. 2015. « Single-Cell Genomics Unveils Critical

- Regulators of Th17 Cell Pathogenicity ». *Cell* 163 (6): 1400-1412. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.11.009>.
- Gherzi-Egea, Jean-François, Nathalie Strazielle, Martin Catala, Violeta Silva-Vargas, Fiona Doetsch, et Britta Engelhardt. 2018. « Molecular Anatomy and Functions of the Choroidal Blood-Cerebrospinal Fluid Barrier in Health and Disease ». *Acta Neuropathologica* 135 (3): 337-61. <https://doi.org/10.1007/s00401-018-1807-1>.
- Gholamzad, Mehrdad, Hussein Baharloo, Mehdi Shafiee Ardestani, Zeinab Seyedkhan, et Maryam Azimi. 2020. « Prophylactic and Therapeutic Effects of MOG-Conjugated PLGA Nanoparticles in C57Bl/6 Mouse Model of Multiple Sclerosis ». *Advanced Pharmaceutical Bulletin* 11 (3): 505-13. <https://doi.org/10.34172/apb.2021.058>.
- Gielen, Marc. 2010. « Fonctionnement des récepteurs-canaux du glutamate: Des protéines responsables de la transmission synaptique excitatrice ». *médecine/sciences* 26 (1): 65-72. <https://doi.org/10.1051/medsci/201026165>.
- Gillain, N., A. Fumal, et J.-M. Minon. 2006. « Bandes oligoclonales et index IgG interprété selon Reiber dans les maladies inflammatoires du système nerveux central ». *Immuno-analyse & Biologie Spécialisée* 21 (6): 348-56. <https://doi.org/10.1016/j.immbio.2006.07.008>.
- Gladding, Clare M., et Lynn A. Raymond. 2011. « Mechanisms Underlying NMDA Receptor Synaptic/Extrasynaptic Distribution and Function ». *Molecular and Cellular Neuroscience* 48 (4): 308-20. <https://doi.org/10.1016/j.mcn.2011.05.001>.
- Gleichman, Amy J., Lynn A. Spruce, Josep Dalmau, Steven H. Seeholzer, et David R. Lynch. 2012. « Anti-NMDA Receptor Encephalitis Antibody Binding Is Dependent on Amino Acid Identity of a Small Region within the GluN1 Amino Terminal Domain ». *The Journal of Neuroscience* 32 (32): 11082-94. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0064-12.2012>.
- Gómez Ávila, Felipe Alberto, Maricarmen Fernández González-Aragón, Álvaro Moreno Avellán, et Daniel San-Juan. 2021. « EEG Findings and Releases From Hospital for Patients With Anti-NMDA Receptor Encephalitis ». *Journal of Clinical Neurophysiology* 38 (6): 530-35. <https://doi.org/10.1097/WNP.0000000000000720>.
- Gonzalez-Burgos, G., et D. A. Lewis. 2012. « NMDA Receptor Hypofunction, Parvalbumin-Positive Neurons, and Cortical Gamma Oscillations in Schizophrenia ». *Schizophrenia Bulletin* 38 (5): 950-57. <https://doi.org/10.1093/schbul/sbs010>.
- Granerod, Julia, Helen E Ambrose, Nicholas WS Davies, Jonathan P Clewley, Amanda L Walsh, Dilys Morgan, Richard Cunningham, et al. 2010. « Causes of Encephalitis and Differences in Their Clinical Presentations in England: A Multicentre, Population-Based Prospective Study ». *The Lancet Infectious Diseases* 10 (12): 835-44. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(10\)70222-X](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(10)70222-X).
- Graus, Francesc, Maarten J Titulaer, Ramani Balu, Susanne Benseler, Christian G Bien, Tania Cellucci, Irene Cortese, et al. 2016. « A Clinical Approach to Diagnosis of Autoimmune Encephalitis ». *The Lancet Neurology* 15 (4): 391-404. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(15\)00401-9](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(15)00401-9).

- Gresa-Arribas, Nuria, Maarten J Titulaer, Abigueli Torrents, Esther Aguilar, Lindsey McCracken, Frank Leypoldt, Amy J Gleichman, et al. 2014. « Antibody Titres at Diagnosis and during Follow-up of Anti-NMDA Receptor Encephalitis: A Retrospective Study ». *The Lancet Neurology* 13 (2): 167-77. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(13\)70282-5](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(13)70282-5).
- Gullickson, Peter, Yunwen W. Xu, Laura J. Niedernhofer, Elizabeth L. Thompson, et Matthew J. Yousefzadeh. 2022. « The Role of DNA Repair in Immunological Diversity: From Molecular Mechanisms to Clinical Ramifications ». *Frontiers in Immunology* 13 (avril): 834889. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.834889>.
- Halverson, Regina, Raul M Torres, et Roberta Pelanda. 2004. « Receptor Editing Is the Main Mechanism of B Cell Tolerance toward Membrane Antigens ». *Nature Immunology* 5 (6): 645-50. <https://doi.org/10.1038/ni1076>.
- Hardy, Todd A, Stephen W Reddel, Michael H Barnett, Jacqueline Palace, Claudia F Lucchinetti, et Brian G Weinschenker. 2016. « Atypical Inflammatory Demyelinating Syndromes of the CNS ». *The Lancet Neurology* 15 (9): 967-81. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(16\)30043-6](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(16)30043-6).
- Harry, Rachel A, Amy E Anderson, John D Isaacs, et Catharien M U Hilkens. 2010. « Generation and Characterisation of Therapeutic Tolerogenic Dendritic Cells for Rheumatoid Arthritis ». *Annals of the Rheumatic Diseases* 69 (11): 2042-50. <https://doi.org/10.1136/ard.2009.126383>.
- Heda, Jackie. 2017. « Biomedical & Scientific visuals ». avril 2017. <https://www.jackieheda.com/brain-affected-autoimmune-encephalitis/>.
- Hillaireau, Hervé, et Patrick Couvreur. 2009. « Nanocarriers' Entry into the Cell: Relevance to Drug Delivery ». *Cellular and Molecular Life Sciences* 66 (17): 2873-96. <https://doi.org/10.1007/s00018-009-0053-z>.
- Hozumi, N., et S. Tonegawa. 2004. « Evidence for Somatic Rearrangement of Immunoglobulin Genes Coding for Variable and Constant Regions. 1976 [Classical Article] ». *Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 173 (7): 4260-64.
- Hughes, E. G., X. Peng, A. J. Gleichman, M. Lai, L. Zhou, R. Tsou, T. D. Parsons, D. R. Lynch, J. Dalmau, et R. J. Balice-Gordon. 2010. « Cellular and Synaptic Mechanisms of Anti-NMDA Receptor Encephalitis ». *Journal of Neuroscience* 30 (17): 5866-75. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.0167-10.2010>.
- Hunter, Zoe, Derrick P. McCarthy, Woon Teck Yap, Christopher T. Harp, Daniel R. Getts, Lonnie D. Shea, et Stephen D. Miller. 2014. « A Biodegradable Nanoparticle Platform for the Induction of Antigen-Specific Immune Tolerance for Treatment of Autoimmune Disease ». *ACS Nano* 8 (3): 2148-60. <https://doi.org/10.1021/nn405033r>.
- Iemura, Yoshiki, Yosuke Yamada, Masahiro Hirata, Tatsuki R. Kataoka, Sachiko Minamiguchi, et Hinonori Haga. 2018. « Histopathological Characterization of the Neuroglial Tissue in Ovarian Teratoma Associated with Anti-N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) Receptor Encephalitis ». *Pathology International* 68 (12): 677-84. <https://doi.org/10.1111/pin.12732>.
- Irani, Sarosh R., Katarzyna Bera, Patrick Waters, Luigi Zuliani, Susan Maxwell, Michael S. Zandi, Manuel A. Friese, et al. 2010. « N-Methyl-d-Aspartate



- Antibody Encephalitis: Temporal Progression of Clinical and Paraclinical Observations in a Predominantly Non-Paraneoplastic Disorder of Both Sexes ». *Brain* 133 (6): 1655-67. <https://doi.org/10.1093/brain/awq113>.
- Jain, Ashish, T. Prescott Atkinson, Peter E. Lipsky, Jay E. Slater, David L. Nelson, et Warren Strober. 1999. « Defects of T-Cell Effector Function and Post-Thymic Maturation in X-Linked Hyper-IgM Syndrome ». *Journal of Clinical Investigation* 103 (8): 1151-58. <https://doi.org/10.1172/JCI5891>.
- Jézéquel, Julie, Emily M. Johansson, Julien P. Dupuis, Véronique Rogemond, Hélène Gréa, Blanka Kellermayer, Nora Hamdani, et al. 2017. « Dynamic Disorganization of Synaptic NMDA Receptors Triggered by Autoantibodies from Psychotic Patients ». *Nature Communications* 8 (1): 1791. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01700-3>.
- Jones, Brian E., Kenneth R. Tovar, April Goehring, Farzad Jalali-Yazdi, Nana J. Okada, Eric Gouaux, et Gary L. Westbrook. 2019. « Autoimmune Receptor Encephalitis in Mice Induced by Active Immunization with Conformationally Stabilized Holoreceptors ». *Science Translational Medicine* 11 (500): eaaw0044. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw0044>.
- Kenison, Jessica E., Aditi Jhaveri, Zhaorong Li, Nikita Khadse, Emily Tjon, Sara Tezza, Dominika Nowakowska, et al. 2020. « Tolerogenic Nanoparticles Suppress Central Nervous System Inflammation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117 (50): 32017-28. <https://doi.org/10.1073/pnas.2016451117>.
- Kim, Ma Rie, Teng Feng, Qian Zhang, Ho Yin Edwin Chan, et Ying Chau. 2019. « Co-Encapsulation and Co-Delivery of Peptide Drugs via Polymeric Nanoparticles ». *Polymers* 11 (2): E288. <https://doi.org/10.3390/polym11020288>.
- Knier, Benjamin, Michael Hiltensperger, Christopher Sie, Lilian Aly, Gildas Lepennetier, Thomas Engleitner, Garima Garg, et al. 2018. « Myeloid-Derived Suppressor Cells Control B Cell Accumulation in the Central Nervous System during Autoimmunity ». *Nature Immunology* 19 (12): 1341-51. <https://doi.org/10.1038/s41590-018-0237-5>.
- Korn, Thomas. 2008. « Pathophysiology of Multiple Sclerosis ». *Journal of Neurology* 255 (S6): 2-6. <https://doi.org/10.1007/s00415-008-6001-2>.
- Korthäuer, Ulf, Daniel Graf, Hans W. Mages, Francine Brière, Munoreedevi Padayachee, Sue Malcolm, Alberto G. Ugazio, Luigi D. Notarangelo, Roland J. Levinsky, et Richard A. Kroczeck. 1993. « Defective Expression of T-Cell CD40 Ligand Causes X-Linked Immunodeficiency with Hyper-IgM ». *Nature* 361 (6412): 539-41. <https://doi.org/10.1038/361539a0>.
- Krienke, Christina, Laura Kolb, Elif Diken, Michael Streuber, Sarah Kirchhoff, Thomas Bukur, Özlem Akilli-Öztürk, et al. 2021. « A Noninflammatory mRNA Vaccine for Treatment of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Science* 371 (6525): 145-53. <https://doi.org/10.1126/science.aay3638>.
- Lai, Kwok-On, et Nancy Y. Ip. 2009. « Synapse Development and Plasticity: Roles of Ephrin/Eph Receptor Signaling ». *Current Opinion in Neurobiology* 19 (3): 275-83. <https://doi.org/10.1016/j.conb.2009.04.009>.
- Lamarque, M., D. Psimaras, F. Ducray, I. Pelieu, R. Sonnevill, S. Demeret, F. Bolgert, et al. 2011. « Encéphalites auto-immunes à anticorps antirécepteurs-NMDA,

- une cause fréquente d'encéphalite en réanimation ». *Réanimation* 20 (5): 397-407. <https://doi.org/10.1007/s13546-011-0275-6>.
- Lee, Choong Man, et Ji Eun Oh. 2022. « Resident Memory B Cells in Barrier Tissues ». *Frontiers in Immunology* 13 (juillet): 953088. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.953088>.
- Lee, Hong-Gyun, Jae-Ung Lee, Do-Hyun Kim, Sangho Lim, Insoo Kang, et Je-Min Choi. 2019. « Pathogenic Function of Bystander-Activated Memory-like CD4+ T Cells in Autoimmune Encephalomyelitis ». *Nature Communications* 10 (1): 709. <https://doi.org/10.1038/s41467-019-08482-w>.
- Lee, Woo-Jin, Soon-Tae Lee, Yong-Won Shin, Han Sang Lee, Hye-Rim Shin, Do-Yong Kim, Soyun Kim, et al. 2021. « Teratoma Removal, Steroid, IVIG, Rituximab and Tocilizumab (T-SIRT) in Anti-NMDAR Encephalitis ». *Neurotherapeutics* 18 (1): 474-87. <https://doi.org/10.1007/s13311-020-00921-7>.
- Link, H., Y. M. Huang, T. Masterman, et B. G. Xiao. 2001. « Vaccination with Autologous Dendritic Cells: From Experimental Autoimmune Encephalomyelitis to Multiple Sclerosis ». *Journal of Neuroimmunology* 114 (1-2): 1-7. [https://doi.org/10.1016/s0165-5728\(01\)00247-8](https://doi.org/10.1016/s0165-5728(01)00247-8).
- Linnoila, Jenny, Benjamin Pulli, Thaís Armangué, Jesús Planagumà, Radha Narsimhan, Stefan Schob, Matthias W.G. Zeller, Josep Dalmau, et John Chen. 2019. « Mouse Model of Anti-NMDA Receptor Post-Herpes Simplex Encephalitis ». *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation* 6 (2): e529. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000000529>.
- Llovera, Gemma, Corinne Benakis, Gaby Enzmann, Ruiyao Cai, Thomas Arzberger, Alireza Ghasemigharagoz, Xiang Mao, et al. 2017. « The Choroid Plexus Is a Key Cerebral Invasion Route for T Cells after Stroke ». *Acta Neuropathologica* 134 (6): 851-68. <https://doi.org/10.1007/s00401-017-1758-y>.
- Lopes, Noëlla, Pierre Ferrier, et Magali Irla. 2015. « Induction de la tolérance centrale dans le thymus par le facteur de transcription Aire ». *médecine/sciences* 31 (8-9): 742-47. <https://doi.org/10.1051/medsci/20153108012>.
- Ludwig-Portugall, Isis, Emma E. Hamilton-Williams, Catherine Gottschalk, et Christian Kurts. 2008. « Cutting Edge: CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Prevent Expansion and Induce Apoptosis of B Cells Specific for Tissue Autoantigens ». *The Journal of Immunology* 181 (7): 4447-51. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.181.7.4447>.
- Luxton, Richard W., Brendan N. McLean, et Thompson Edward J. 1990. « Isoelectric Focusing versus Quantitative Measurements in the Detection of Intrathecal Local Synthesis of IgG ». *Clinica Chimica Acta* 187 (3): 297-308. [https://doi.org/10.1016/0009-8981\(90\)90115-9](https://doi.org/10.1016/0009-8981(90)90115-9).
- Macrez, Richard, Maria C. Ortega, Isabelle Bardou, Anupriya Mehra, Antoine Fournier, Susanne M. A. Van der Pol, Benoit Haelewyn, et al. 2016. « Neuroendothelial NMDA Receptors as Therapeutic Targets in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis ». *Brain* 139 (9): 2406-19. <https://doi.org/10.1093/brain/aww172>.
- Malter, Michael P., Christian E. Elger, et Rainer Surges. 2013. « Diagnostic Value of CSF Findings in Antibody-Associated Limbic and Anti-NMDAR-Encephalitis ». *Seizure* 22 (2): 136-40. <https://doi.org/10.1016/j.seizure.2012.12.013>.

- Malviya, Manish, Sumanta Barman, Kristin S. Golombeck, Jesús Planagumà, Francesco Mannara, Nathalie Strutz-Seebohm, Claudia Wrzos, et al. 2017. « NMDAR Encephalitis: Passive Transfer from Man to Mouse by a Recombinant Antibody ». *Annals of Clinical and Translational Neurology* 4 (11): 768-83. <https://doi.org/10.1002/acn3.444>.
- Martinez-Pasamar, Sara, Elena Abad, Beatriz Moreno, Nieves Velez de Mendizabal, Ivan Martinez-Forero, Jordi Garcia-Ojalvo, et Pablo Villoslada. 2013. « Dynamic Cross-Regulation of Antigen-Specific Effector and Regulatory T Cell Subpopulations and Microglia in Brain Autoimmunity ». *BMC Systems Biology* 7 (1): 34. <https://doi.org/10.1186/1752-0509-7-34>.
- Mathian, A., L. Arnaud, et Z. Amoura. 2014. « Physiopathologie du lupus systémique : le point en 2014 ». *La Revue de Médecine Interne* 35 (8): 503-11. <https://doi.org/10.1016/j.revmed.2013.10.334>.
- Mathis, Diane, et Christophe Benoist. 2007. « A Decade of AIRE ». *Nature Reviews Immunology* 7 (8): 645-50. <https://doi.org/10.1038/nri2136>.
- Matute, Carlos, Ana Palma, María Paz Serrano-Regal, Estibaliz Maudes, Sumanta Barman, María Victoria Sánchez-Gómez, María Domercq, Norbert Goebels, et Josep Dalmau. 2020. « N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antibodies in Autoimmune Encephalopathy Alter Oligodendrocyte Function ». *Annals of Neurology* 87 (5): 670-76. <https://doi.org/10.1002/ana.25699>.
- Mc Carthy, David J., Meenakshi Malhotra, Aoife M. O'Mahony, John F. Cryan, et Caitriona M. O'Driscoll. 2015. « Nanoparticles and the Blood-Brain Barrier: Advancing from In-Vitro Models Towards Therapeutic Significance ». *Pharmaceutical Research* 32 (4): 1161-85. <https://doi.org/10.1007/s11095-014-1545-6>.
- Merino, Pedro. 2019. *Chemical Biology of Neurodegeneration: A Molecular Approach*. 1<sup>re</sup> éd. Wiley. <https://doi.org/10.1002/9783527813421>.
- Methia, N., P. André, A. Hafezi-Moghadam, M. Economopoulos, K. L. Thomas, et D. D. Wagner. 2001. « ApoE Deficiency Compromises the Blood Brain Barrier Especially after Injury ». *Molecular Medicine (Cambridge, Mass.)* 7 (12): 810-15.
- Michel, Laure, Camille Grasmuck, Marc Charabati, Marc-André Lécuyer, Stephanie Zandee, Tessa Dhaeze, Jorge I. Alvarez, et al. 2019. « Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule Regulates B Lymphocyte Migration across Central Nervous System Barriers ». *Science Translational Medicine* 11 (518): eaaw0475. <https://doi.org/10.1126/scitranslmed.aaw0475>.
- Mihara, Masahiko, Keiko Kasutani, Makoto Okazaki, Akito Nakamura, Shigeto Kawai, Masamichi Sugimoto, Yoshihiro Matsumoto, et Yoshiyuki Ohsugi. 2005. « Tocilizumab Inhibits Signal Transduction Mediated by Both IL-6R and sIL-6R, but Not by the Receptors of Other Members of IL-6 Cytokine Family ». *International Immunopharmacology* 5 (12): 1731-40. <https://doi.org/10.1016/j.intimp.2005.05.010>.
- Mikasova, Lenka, Pierre De Rossi, Delphine Bouchet, François Georges, Véronique Rogemond, Adrien Didelot, Claire Meissirel, Jérôme Honnorat, et Laurent Groc. 2012. « Disrupted Surface Cross-Talk between NMDA and Ephrin-B2 Receptors in Anti-NMDA Encephalitis ». *Brain* 135 (5): 1606-21. <https://doi.org/10.1093/brain/aws092>.

- Mitarotonda, Romina, Exequiel Giorgi, Tatiane Eufrazio-da-Silva, Alireza Dolatshahi-Pirouz, Yogendra Kumar Mishra, Ali Khademhosseini, Martin F. Desimone, Mauricio De Marzi, et Gorka Orive. 2022. « Immunotherapeutic Nanoparticles: From Autoimmune Disease Control to the Development of Vaccines ». *Biomaterials Advances* 135 (avril): 212726. <https://doi.org/10.1016/j.bioadv.2022.212726>.
- Mitsdoerffer, Meike, Youjin Lee, Anneli Jäger, Hye-Jung Kim, Thomas Korn, Jay K. Kolls, Harvey Cantor, Estelle Bettelli, et Vijay K. Kuchroo. 2010. « Proinflammatory T Helper Type 17 Cells Are Effective B-Cell Helpers ». *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 107 (32): 14292-97. <https://doi.org/10.1073/pnas.1009234107>.
- Mombaerts, P., J. Iacomini, R. S. Johnson, K. Herrup, S. Tonegawa, et V. E. Papaioannou. 1992. « RAG-1-Deficient Mice Have No Mature B and T Lymphocytes ». *Cell* 68 (5): 869-77. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90030-g](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90030-g).
- Montagne, Axel, Maxime Gauberti, Richard Macrez, Amandine Jullienne, Aurélien Briens, Jean-Sébastien Raynaud, Gaelle Louin, et al. 2012. « Ultra-Sensitive Molecular MRI of Cerebrovascular Cell Activation Enables Early Detection of Chronic Central Nervous System Disorders ». *NeuroImage* 63 (2): 760-70. <https://doi.org/10.1016/j.neuroimage.2012.07.018>.
- Moscato, Emilia H, Xiaoyu Peng, Ankit Jain, Thomas D Parsons, Josep Dalmau, et Rita J Balice-Gordon. 2014. « Acute Mechanisms Underlying Antibody Effects in Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis ». *Annals of Neurology* 76 (1): 108-19. <https://doi.org/10.1002/ana.24195>.
- Musumeci, Teresa, Giulia Di Benedetto, Claudia Carbone, Angela Bonaccorso, Giovanni Amato, Maria Josè Lo Faro, Chiara Burgaletto, Giovanni Puglisi, Renato Bernardini, et Giuseppina Cantarella. 2022. « Intranasal Administration of a TRAIL Neutralizing Monoclonal Antibody Adsorbed in PLGA Nanoparticles and NLC Nanosystems: An In Vivo Study on a Mouse Model of Alzheimer's Disease ». *Biomedicines* 10 (5): 985. <https://doi.org/10.3390/biomedicines10050985>.
- Nilsen, Ellen M., Frode L. Jahnsen, Knut E.A. Lundin, Finn-Eirik Johansen, Olav Fausa, Ludvig M. Sollid, Jørgen Jahnsen, Helge Scott, et Per Brandtzaeg. 1998. « Gluten Induces an Intestinal Cytokine Response Strongly Dominated by Interferon Gamma in Patients with Celiac Disease ». *Gastroenterology* 115 (3): 551-63. [https://doi.org/10.1016/S0016-5085\(98\)70134-9](https://doi.org/10.1016/S0016-5085(98)70134-9).
- Noon, L. 1911. « PROPHYLACTIC INOCULATION AGAINST HAY FEVER ». *The Lancet* 177 (4580): 1572-73. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(00\)78276-6](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(00)78276-6).
- Pagoto, Amerigo, Rachele Stefania, Francesca Garello, Francesca Arena, Giuseppe Digilio, Silvio Aime, et Enzo Terreno. 2016. « Paramagnetic Phospholipid-Based Micelles Targeting VCAM-1 Receptors for MRI Visualization of Inflammation ». *Bioconjugate Chemistry* 27 (8): 1921-30. <https://doi.org/10.1021/acs.bioconjchem.6b00308>.
- Pan, Hong, Bárbara Oliveira, Gesine Saher, Ekrem Dere, Daniel Tapken, Marina Mitjans, Jan Seidel, et al. 2019. « Uncoupling the Widespread Occurrence of Anti-NMDAR1 Autoantibodies from Neuropsychiatric Disease in a Novel



- Autoimmune Model ». *Molecular Psychiatry* 24 (10): 1489-1501. <https://doi.org/10.1038/s41380-017-0011-3>.
- Panariello, Adelaide, Roberta Bassetti, Anna Radice, Roberto Rossotti, Massimo Puoti, Matteo Corradin, Mauro Moreno, et Mauro Percudani. 2020. « Anti-NMDA Receptor Encephalitis in a Psychiatric Covid-19 Patient: A Case Report ». *Brain, Behavior, and Immunity* 87 (juillet): 179-81. <https://doi.org/10.1016/j.bbi.2020.05.054>.
- Paoletti, Pierre, Camilla Bellone, et Qiang Zhou. 2013. « NMDA Receptor Subunit Diversity: Impact on Receptor Properties, Synaptic Plasticity and Disease ». *Nature Reviews Neuroscience* 14 (6): 383-400. <https://doi.org/10.1038/nrn3504>.
- Parker Harp, Chelsea R., Angela S. Archambault, Matthew Cheung, Jesse W. Williams, Rafael S. Czepielewski, Patrick C. Duncker, Aaron J. Kilgore, et al. 2019. « Neutrophils Promote VLA-4–Dependent B Cell Antigen Presentation and Accumulation within the Meninges during Neuroinflammation ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116 (48): 24221-30. <https://doi.org/10.1073/pnas.1909098116>.
- Petersone, Lina, Natalie M. Edner, Vitalijs Ovcinnikovs, Frank Heuts, Ellen M. Ross, Elisavet Ntavli, Chun J. Wang, et Lucy S. K. Walker. 2018. « T Cell/B Cell Collaboration and Autoimmunity: An Intimate Relationship ». *Frontiers in Immunology* 9 (août): 1941. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01941>.
- Petralia, Rs, N Yokotani, et Rj Wenthold. 1994. « Light and Electron Microscope Distribution of the NMDA Receptor Subunit NMDAR1 in the Rat Nervous System Using a Selective Anti-Peptide Antibody ». *The Journal of Neuroscience* 14 (2): 667-96. <https://doi.org/10.1523/JNEUROSCI.14-02-00667.1994>.
- Pieper, Kathrin, Bodo Grimbacher, et Hermann Eibel. 2013. « B-Cell Biology and Development ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 131 (4): 959-71. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2013.01.046>.
- Planagumà, Jesús, Frank Leypoldt, Francesco Mannara, Javier Gutiérrez-Cuesta, Elena Martín-García, Esther Aguilar, Maarten J. Titulaer, et al. 2015. « Human N-Methyl D-Aspartate Receptor Antibodies Alter Memory and Behaviour in Mice ». *Brain* 138 (1): 94-109. <https://doi.org/10.1093/brain/awu310>.
- Pol, Suyog, Ferdinand Schweser, Nicola Bertolino, Marilena Preda, Michele Sveinsson, Michelle Sudyn, Natan Babek, et Robert Zivadinov. 2019. « Characterization of Leptomeningeal Inflammation in Rodent Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) Model of Multiple Sclerosis ». *Experimental Neurology* 314 (avril): 82-90. <https://doi.org/10.1016/j.expneurol.2019.01.013>.
- Prasad, Suchitra, Tobias Neef, Dan Xu, Joseph R. Podojil, Daniel R. Getts, Lonnie D. Shea, et Stephen D. Miller. 2018. « Tolerogenic Ag-PLG Nanoparticles Induce Tregs to Suppress Activated Diabetogenic CD4 and CD8 T Cells ». *Journal of Autoimmunity* 89 (mai): 112-24. <https://doi.org/10.1016/j.jaut.2017.12.010>.
- Pruss, H., J. Dalmau, L. Harms, M. Holtje, G. Ahnert-Hilger, K. Borowski, W. Stoecker, et K. P. Wandinger. 2010. « Retrospective Analysis of NMDA Receptor Antibodies in Encephalitis of Unknown Origin ». *Neurology* 75 (19): 1735-39. <https://doi.org/10.1212/WNL.0b013e3181fc2a06>.

- Prybylowski, Kate, et Robert J. Wenthold. 2004. « N-Methyl-D-Aspartate Receptors: Subunit Assembly and Trafficking to the Synapse ». *Journal of Biological Chemistry* 279 (11): 9673-76. <https://doi.org/10.1074/jbc.R300029200>.
- Reboldi, Andrea, Caroline Coisne, Dirk Baumjohann, Federica Benvenuto, Denise Bottinelli, Sergio Lira, Antonio Uccelli, Antonio Lanzavecchia, Britta Engelhardt, et Federica Sallusto. 2009. « C-C Chemokine Receptor 6–Regulated Entry of TH-17 Cells into the CNS through the Choroid Plexus Is Required for the Initiation of EAE ». *Nature Immunology* 10 (5): 514-23. <https://doi.org/10.1038/ni.1716>.
- Regan, Michael C, Annabel Romero-Hernandez, et Hiro Furukawa. 2015. « A Structural Biology Perspective on NMDA Receptor Pharmacology and Function ». *Current Opinion in Structural Biology* 33 (août): 68-75. <https://doi.org/10.1016/j.sbi.2015.07.012>.
- Ribeiro, Miguel, Helena C. Brigas, Mariana Temido-Ferreira, Paula A. Pousinha, Tommy Regen, Cátia Santa, Joana E. Coelho, et al. 2019. « Meningeal  $\gamma\delta$  T Cell-Derived IL-17 Controls Synaptic Plasticity and Short-Term Memory ». *Science Immunology* 4 (40): eaay5199. <https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aay5199>.
- Rosenblum, Michael D., Kelly A. Remedios, et Abul K. Abbas. 2015. « Mechanisms of Human Autoimmunity ». *Journal of Clinical Investigation* 125 (6): 2228-33. <https://doi.org/10.1172/JCI78088>.
- Rua, Rejane, et Dorian B. McGavern. 2018. « Advances in Meningeal Immunity ». *Trends in Molecular Medicine* 24 (6): 542-59. <https://doi.org/10.1016/j.molmed.2018.04.003>.
- Sallusto, Federica, Danielle Lenig, Reinhold Förster, Martin Lipp, et Antonio Lanzavecchia. 1999. « Two Subsets of Memory T Lymphocytes with Distinct Homing Potentials and Effector Functions ». *Nature* 401 (6754): 708-12. <https://doi.org/10.1038/44385>.
- Sarigecili, Esra, Ilknur Arslan, Habibe Koc Ucar, et Umit Celik. 2021. « Pediatric Anti-NMDA Receptor Encephalitis Associated with COVID-19 ». *Child's Nervous System*, avril. <https://doi.org/10.1007/s00381-021-05155-2>.
- Schipke, Carola G., Carsten Ohlemeyer, Marina Matyash, Christiane Nolte, Helmut Kettenmann, et Frank Kirchhoff. 2001. « Astrocytes of the Mouse Neocortex Express Functional N-methyl-D-aspartate Receptors ». *The FASEB Journal* 15 (7): 1270-72. <https://doi.org/10.1096/fj.00-0439fje>.
- Schläger, Christian, Henrike Körner, Martin Krueger, Stefano Vidoli, Michael Haberl, Dorothee Mielke, Elke Brylla, et al. 2016. « Effector T-Cell Trafficking between the Leptomeninges and the Cerebrospinal Fluid ». *Nature* 530 (7590): 349-53. <https://doi.org/10.1038/nature16939>.
- Schwenkenbecher, Philipp, Thomas Skripuletz, Peter Lange, Marc Dürr, Felix F. Konen, Nora Möhn, Marius Ringelstein, et al. 2021. « Intrathecal Antibody Production Against Epstein-Barr, Herpes Simplex, and Other Neurotropic Viruses in Autoimmune Encephalitis ». *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation* 8 (6): e1062. <https://doi.org/10.1212/NXI.0000000000001062>.

- Scott, C. S., S. J. Richards, et B. E. Roberts. 1990. « Patterns of Membrane TcR Alpha Beta and TcR Gamma Delta Chain Expression by Normal Blood CD4+CD8-, CD4-CD8+, CD4-CD8dim+ and CD4-CD8- Lymphocytes ». *Immunology* 70 (3): 351-56.
- Senger, Kate, Jason Hackney, Jian Payandeh, et Ali A. Zarrin. 2015. « Antibody Isotype Switching in Vertebrates ». In *Pathogen-Host Interactions: Antigenic Variation v. Somatic Adaptations*, édité par Ellen Hsu et Louis Du Pasquier, 57:295-324. Results and Problems in Cell Differentiation. Cham: Springer International Publishing. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20819-0\\_13](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20819-0_13).
- Shim, YoungKyu, Soo Yeon Kim, Hunmin Kim, Hee Hwang, Jong-Hee Chae, Jieun Choi, Ki Joong Kim, et al. 2020. « Clinical Outcomes of Pediatric Anti-NMDA Receptor Encephalitis ». *European Journal of Paediatric Neurology* 29 (novembre): 87-91. <https://doi.org/10.1016/j.ejpn.2020.10.001>.
- Shin, Yong-Won, Soon-Tae Lee, Kyung-Il Park, Keun-Hwa Jung, Ki-Young Jung, Sang Kun Lee, et Kon Chu. 2018. « Treatment Strategies for Autoimmune Encephalitis ». *Therapeutic Advances in Neurological Disorders* 11 (janvier): 175628561772234. <https://doi.org/10.1177/1756285617722347>.
- Shinkai, Y., G. Rathbun, K. P. Lam, E. M. Oltz, V. Stewart, M. Mendelsohn, J. Charron, M. Datta, F. Young, et A. M. Stall. 1992. « RAG-2-Deficient Mice Lack Mature Lymphocytes Owing to Inability to Initiate V(D)J Rearrangement ». *Cell* 68 (5): 855-67. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(92\)90029-c](https://doi.org/10.1016/0092-8674(92)90029-c).
- Simoni, Y, J Diana, L Ghazarian, L Beaudoin, et A Lehuen. 2012. « Therapeutic Manipulation of Natural Killer (NK) T Cells in Autoimmunity: Are We Close to Reality? ». *Clinical and Experimental Immunology* 171 (1): 8-19. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2249.2012.04625.x>.
- Smarr, Charles B., Woon Teck Yap, Tobias P. Neef, Ryan M. Pearson, Zoe N. Hunter, Igal Ifergan, Daniel R. Getts, Paul J. Bryce, Lonnie D. Shea, et Stephen D. Miller. 2016. « Biodegradable Antigen-Associated PLG Nanoparticles Tolerize Th2-Mediated Allergic Airway Inflammation Pre- and Postsensitization ». *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113 (18): 5059-64. <https://doi.org/10.1073/pnas.1505782113>.
- Song, Qian, Ge Feng, Jiaying Zhang, Xuechun Xia, Min Ji, Lei Lv, et Yong Ping. 2017. « NMDA Receptor-Mediated Ca<sup>2+</sup> Influx in the Absence of Mg<sup>2+</sup> Block Disrupts Rest: Activity Rhythms in *Drosophila* ». *Sleep* 40 (12). <https://doi.org/10.1093/sleep/zsx166>.
- Sonobe, Yoshifumi, Shijie Jin, Jinyan Wang, Jun Kawanokuchi, Hideyuki Takeuchi, Tetsuya Mizuno, et Akio Suzumura. 2007. « Chronological Changes of CD4+ and CD8+ T Cell Subsets in the Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, a Mouse Model of Multiple Sclerosis ». *The Tohoku Journal of Experimental Medicine* 213 (4): 329-39. <https://doi.org/10.1620/tjem.213.329>.
- Steffen, B. J., G. Breier, E. C. Butcher, M. Schulz, et B. Engelhardt. 1996. « ICAM-1, VCAM-1, and MAdCAM-1 Are Expressed on Choroid Plexus Epithelium but Not Endothelium and Mediate Binding of Lymphocytes in Vitro ». *The American Journal of Pathology* 148 (6): 1819-38.
- Strominger, Itai, Yehezqel Elyahu, Omer Berner, Jensen Reckhow, Kritika Mittal, Anna Nemirovsky, et Alon Monsonego. 2018. « The Choroid Plexus Functions as a



- Niche for T-Cell Stimulation Within the Central Nervous System ». *Frontiers in Immunology* 9 (mai): 1066. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.01066>.
- Sun, Deming, John N. Whitaker, Zhigang Huang, Di Liu, Christopher Coleclough, Hartmut Wekerle, et Cedric S. Raine. 2001. « Myelin Antigen-Specific CD8<sup>+</sup> T Cells Are Encephalitogenic and Produce Severe Disease in C57BL/6 Mice ». *The Journal of Immunology* 166 (12): 7579-87. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.166.12.7579>.
- Sundstedt, Anette, Emma J. O'Neill, Kirsty S. Nicolson, et David C. Wraith. 2003. « Role for IL-10 in Suppression Mediated by Peptide-Induced Regulatory T Cells In Vivo ». *The Journal of Immunology* 170 (3): 1240-48. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.170.3.1240>.
- Takagi, Atsushi, Chiharu Nishiyama, Shunsuke Kanada, Yusuke Niwa, Kanako Fukuyama, Shigaku Ikeda, Ko Okumura, et Hideoki Ogawa. 2006. « Prolonged MHC Class II Expression and CIITA Transcription in Human Keratinocytes ». *Biochemical and Biophysical Research Communications* 347 (2): 388-93. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.05.215>.
- Tan, Queenie K.-G., Raymond J. Louie, et John W. Sleasman. 1993. « IPEX Syndrome ». In *GeneReviews®*, édité par Margaret P. Adam, David B. Everman, Ghayda M. Mirzaa, Roberta A. Pagon, Stephanie E. Wallace, Lora JH Bean, Karen W. Gripp, et Anne Amemiya. Seattle (WA): University of Washington, Seattle. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK1118/>.
- Titulaer, Maarten J, Lindsey McCracken, Iñigo Gabilondo, Thaís Armangué, Carol Glaser, Takahiro Iizuka, Lawrence S Honig, et al. 2013. « Treatment and Prognostic Factors for Long-Term Outcome in Patients with Anti-NMDA Receptor Encephalitis: An Observational Cohort Study ». *The Lancet Neurology* 12 (2): 157-65. [https://doi.org/10.1016/S1474-4422\(12\)70310-1](https://doi.org/10.1016/S1474-4422(12)70310-1).
- Torres, Richard, Bonnie L Firestein, Hualing Dong, Jeff Staudinger, Eric N Olson, Richard L Haganir, David S Bredt, Nicholas W Gale, et George D Yancopoulos. 1998. « PDZ Proteins Bind, Cluster, and Synaptically Colocalize with Eph Receptors and Their Ephrin Ligands ». *Neuron* 21 (6): 1453-63. [https://doi.org/10.1016/S0896-6273\(00\)80663-7](https://doi.org/10.1016/S0896-6273(00)80663-7).
- Veen, Willem van de, Barbara Stanic, Oliver F. Wirz, Kirstin Jansen, Anna Globinska, et Mübeccel Akdis. 2016. « Role of Regulatory B Cells in Immune Tolerance to Allergens and Beyond ». *Journal of Allergy and Clinical Immunology* 138 (3): 654-65. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2016.07.006>.
- Venkatesan, Arun. 2015. « Epidemiology and Outcomes of Acute Encephalitis ». *Current Opinion in Neurology* 28 (3): 277-82. <https://doi.org/10.1097/WCO.0000000000000199>.
- Vignali, Dario A. A., Lauren W. Collison, et Creg J. Workman. 2008. « How Regulatory T Cells Work ». *Nature Reviews. Immunology* 8 (7): 523-32. <https://doi.org/10.1038/nri2343>.
- Villartay, Jean-Pierre de, Alain Fischer, et Anne Durandy. 2003. « The Mechanisms of Immune Diversification and Their Disorders ». *Nature Reviews. Immunology* 3 (12): 962-72. <https://doi.org/10.1038/nri1247>.

- Vyklicky, V., M. Korinek, T. Smejkalova, A. Balik, B. Krausova, M. Kaniakova, K. Lichnerova, et al. 2014. « Structure, Function, and Pharmacology of NMDA Receptor Channels ». *Physiological Research*, février, S191-203. <https://doi.org/10.33549/physiolres.932678>.
- Wagner, Catriona A., Pamela J. Roqué, Trevor R. Mileur, Denny Liggitt, et Joan M. Goverman. 2019. « Myelin-Specific CD8+ T Cells Exacerbate Brain Inflammation in CNS Autoimmunity ». *Journal of Clinical Investigation* 130 (1): 203-13. <https://doi.org/10.1172/JCI132531>.
- Wagnon, Isabelle, Pauline Hélie, Isabelle Bardou, Caroline Regnault, Léonie Lesec, Jérôme Leprince, Mikaël Naveau, et al. 2020. « Autoimmune Encephalitis Mediated by B-Cell Response against N-Methyl-d-Aspartate Receptor ». *Brain* 143 (10): 2957-72. <https://doi.org/10.1093/brain/awaa250>.
- Washburn, Halley R., Nan L. Xia, Wei Zhou, Yu-Ting Mao, et Matthew B. Dalva. 2020. « Positive Surface Charge of GluN1 N-Terminus Mediates the Direct Interaction with EphB2 and NMDAR Mobility ». *Nature Communications* 11 (1): 570. <https://doi.org/10.1038/s41467-020-14345-6>.
- Wekerle, H., C. Linington, H. Lassmann, et R. Meyermann. 1986. « Cellular Immune Reactivity within the CNS ». *Trends in Neurosciences* 9 (janvier): 271-77. [https://doi.org/10.1016/0166-2236\(86\)90077-9](https://doi.org/10.1016/0166-2236(86)90077-9).
- Wright, Sukhvir, Yael Hachon, Leslie Jacobson, Shakti Agrawal, Rajat Gupta, Sunny Philip, Martin Smith, Ming Lim, Evangeline Wassmer, et Angela Vincent. 2015. « N-Methyl-D-Aspartate Receptor Antibody-Mediated Neurological Disease: Results of a UK-Based Surveillance Study in Children ». *Archives of Disease in Childhood* 100 (6): 521-26. <https://doi.org/10.1136/archdischild-2014-306795>.
- Wright, Sukhvir, Kevan Hashemi, Lukasz Stasiak, Julian Bartram, Bethan Lang, Angela Vincent, et A. Louise Upton. 2015. « Epileptogenic Effects of NMDAR Antibodies in a Passive Transfer Mouse Model ». *Brain* 138 (11): 3159-67. <https://doi.org/10.1093/brain/awv257>.
- Wu, Zhiheng, Yu Zheng, Jin Sheng, Yicheng Han, Yanyan Yang, Hongming Pan, et Junlin Yao. 2022. « CD3+CD4-CD8- (Double-Negative) T Cells in Inflammation, Immune Disorders and Cancer ». *Frontiers in Immunology* 13 (février): 816005. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2022.816005>.
- Yoshio, Taku, Koichi Onda, Hiroyuki Nara, et Seiji Minota. 2006. « Association of IgG Anti-NR2 Glutamate Receptor Antibodies in Cerebrospinal Fluid with Neuropsychiatric Systemic Lupus Erythematosus ». *Arthritis & Rheumatism* 54 (2): 675-78. <https://doi.org/10.1002/art.21547>.
- Zhao, Bailey, et David G. Nelson. 2019. « Anti-N-Methyl-D-Aspartate Receptor Encephalitis: A Challenging Diagnosis in the Emergency Department ». *Pediatric Emergency Care* 35 (9): e159-61. <https://doi.org/10.1097/PEC.0000000000001853>.
- Zhao, Jiacheng, et Martina H. Stenzel. 2018. « Entry of Nanoparticles into Cells: The Importance of Nanoparticle Properties ». *Polymer Chemistry* 9 (3): 259-72. <https://doi.org/10.1039/C7PY01603D>.
- Zheng, Yiming, Jingjing Luo, Haiqiang Jin, Feng Gao, et Hongjun Hao. 2020. « Cerebrospinal Fluid CD20 Positive B-Cell Expansion in a Case of Anti-

NMDAR Encephalitis ». *Journal of Neuroimmunology* 349 (décembre): 577365.  
<https://doi.org/10.1016/j.jneuroim.2020.577365>.



## Etude de la réponse lymphocytaire T contre le récepteur au N-Méthyl-D-Aspartate dans un modèle murin d'encéphalite autoimmune

### Résumé

L'encéphalite autoimmune (EA) à anticorps (Ac) anti-récepteur au N-Méthyl-D-Aspartate (NMDAR) est une pathologie impliquant des auto-Ac ciblant la sous-unité GluN1 du NMDAR. Cette pathologie dont les étiologies, connues à ce jour, sont la présence d'une tumeur ou une infection à Herpes Simplex Virus, touche principalement les femmes jeunes. Des troubles neurologiques et psychiatriques sont observés et le diagnostic se base principalement sur la détection d'Ac anti-NMDAR dans le liquide céphalo-rachidien. L'implication des lymphocytes B, et plus précisément le rôle des Ac pathogéniques dans la maladie est bien décrit dans la littérature. Cependant, les mécanismes immunologiques impliqués en amont de la génération des Ac sont largement méconnus, et notamment le rôle des lymphocytes T helper (Th). L'aide de ces derniers peut être requise pour la mise en place d'une réponse immunitaire avec production d'Ac. Notre laboratoire a développé un modèle murin d'EA à Ac anti-NMDAR par immunisation active avec un peptide issu de la sous-unité GluN1. Le modèle présente des troubles comportementaux du même type que ceux retrouvés chez les patients, soit des troubles de la mémoire et une anxiété. Dans le but de mieux comprendre les mécanismes immunologiques impliqués dans l'EA à Ac anti-NMDAR, nous nous sommes intéressés à la réponse lymphocytaire T dirigée contre GluN1. Nous avons identifié et caractérisé cette réponse au niveau de la rate et du SNC. Quinze jours après l'immunisation des souris avec le peptide GluN1<sub>359-378</sub>, les cellules ont été réactivées *in vitro* et une augmentation spécifique du niveau d'expression des marqueurs d'activation et/ou du pourcentage de cellules (CD69, CD25, CD40L) a été observée. Le profil des lymphocytes T spécifiques a été identifié comme étant polyfonctionnel (Th1, Th17 et Th folliculaires/Th2) dans la rate. Nous avons développé une stratégie d'immunothérapie tolérrogène grâce à l'utilisation de nanoparticules (NP) à base de PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)), encapsulant le peptide GluN1. L'injection de ces NP PLGA GluN1, 7 jours en amont de l'immunisation des animaux, permet de prévenir l'activation des lymphocytes T CD4 et CD8. Cependant, les tests comportementaux ne nous ont pas permis de mettre en évidence un effet des NP PLGA GluN1. Pour conclure, notre étude est un point de départ pour une meilleure compréhension du rôle des lymphocytes T dans l'EA à Ac anti-NMDAR. Bien qu'encore au stade d'étude pré-clinique, l'utilisation de NP PLGA, quant à elle, ouvre de nouvelles perspectives dans le développement de stratégies thérapeutiques tolérrogènes.

**Mots clés :** EA à Ac anti-NMDAR, modèle murin, peptide GluN1, lymphocytes T et B, activation spécifique, NP PLGA, immunothérapie tolérrogène.

### Abstract

Anti-N-Methyl-D-Aspartate (NMDA) autoimmune encephalitis (NMDAR AE) is an autoimmune disease characterized by auto-antibodies (Ab) against the GluN1 subunit of NMDAR. The etiologies known of this pathology are the presence of a tumor or an infection with Herpes Simplex Virus and young women are most often affected. Neurological and psychiatric symptoms are observed and the diagnosis is mainly based on detection of anti-NMDAR Ab in cerebrospinal fluid. The involvement of B cells, and more specifically the role of pathogenic Ab in the pathology, is well described in the literature. However, the immune mechanisms involved upstream the generation of Ab are poorly understood, especially the role of T helper (Th) cells. The help of T helper cells may be required for the establishment of an immune response with Ab production. Our laboratory has developed a mouse model of NMDAR AE by active immunization with a peptide from the GluN1 subunit. This model presents behavioral disorders as the same type as those found in patients, such as memory impairments and anxiety. In order to better understand the immunological mechanisms involved in NMDAR AE, we focused on the T cell response against GluN1. We identified and characterized this response in the spleen and CNS. Fifteen days after immunization of mice with GluN1<sub>359-378</sub> peptide, cells were *in vitro* reactivated and a specific increase of the expression level of activated markers and/or percentage of cells (CD69, CD25, CD40L) was observed. T cell profile in the spleen is polyfunctional (Th1, Th17 and Th follicular/Th2). We developed a tolerogenic immunotherapy strategy using nanoparticles (NP) based on PLGA (poly(lactic-co-glycolic acid)), loaded with GluN1 peptide. The injection of these PLGA GluN1 NP, 7 days before immunization, prevents the CD4 and CD8 T cell activation. However, the behavioral tests didn't allow us to demonstrate an effect of these NP. In conclusion, our study is a starting point for a better understanding of the role of T cell in NMDAR AE. Although at the pre-clinical step, the use of NP PLGA opens up new perspectives in the development of tolerogenic therapeutic strategies.

**Keywords:** NMDAR AE, mouse model, GluN1 peptide, T and B cells, specific activation, NP PLGA, tolerogenic immunotherapy.