

Université de Montréal

**Caractérisation du rôle de MCAM dans la sclérose en
plaques**

par

Catherine Larochelle

Département des Neurosciences

Faculté de Médecine

Thèse présentée à la Faculté de Médecine
en vue de l'obtention du grade de PhD
en Neurosciences

Avril, 2014

© Catherine Larochelle, 2014

Résumé

Objectifs: Chez les patients atteints de sclérose en plaques (SEP), des lymphocytes pro-inflammatoires utilisent des molécules d'adhérence afin de parvenir à traverser la barrière hémato-encéphalique (BHE) et former des lésions multifocales dans le système nerveux central (SNC). Dans le contexte de la SEP, les lymphocytes CD4 auto-agressifs polarisés en TH17 (sécrétant de l'IL-17) sont reconnus comme contribuant à la formation des lésions. Le rôle des lymphocytes CD8 Tc17 est quant à lui encore mal défini. L'identification de marqueurs de surface spécifiquement exprimés par les lymphocytes TH17 et Tc17 faciliterait la caractérisation de ces sous-populations pathogéniques et fournirait de nouvelles cibles thérapeutiques pour traiter la SEP.

Méthodologie: Nous avons identifié MCAM lors d'analyses protéomiques de cellules endothéliales de la BHE humaine et de lymphocytes T humains. Nous avons caractérisé le phénotype et la fonction de ces cellules exprimant MCAM *ex vivo*, *in vitro*, *in situ* et *in vivo*, à partir de matériel obtenu de témoins (contrôles), de patients atteints de SEP et d'animaux atteints d'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

Résultats: MCAM est exprimé à la fois par les cellules endothéliales de la BHE humaine et par une sous-population de lymphocytes T effecteurs mémoire CD161⁺ et CCR6⁺. Les lymphocytes CD4 et CD8 MCAM⁺ expriment plus d'IL-17, IL-22, GM-CSF et granzyme B (Gz B) que les lymphocytes MCAM^{neg}. De plus, l'expression de MCAM est fortement augmentée à la surface des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ lors des poussées de SEP, alors que les traitements immunomodulateurs en diminuent l'expression. *In situ*, l'expression de MCAM par les cellules endothéliales de la BHE est plus marquée au site des lésions de SEP et d'EAE, et on retrouve des lymphocytes CD4 et CD8 MCAM⁺ au sein de ces infiltrats périvasculaires du SNC. *In vitro*, les lymphocytes CD8 MCAM⁺ causent plus de mort oligodendrocytaire et bloquer MCAM diminue la transmigration des CD8 Tc17 et des CD4 TH17 à travers les cellules endothéliales de la BHE humaine. *In vivo*, dépléter les lymphocytes CD4 ou CD8 MCAM⁺ améliore les signes cliniques de l'EAE par transfert. Par ailleurs, l'expression de MCAM est régulée à la hausse à la surface des lymphocytes CD4 et CD8 de la souris transgénique TCR1640, un modèle animal d'EAE spontanée. Finalement, bloquer MCAM

atténue les déficits neurologiques chroniques aussi bien du modèle d'EAE induite avec le MOG₃₅₋₅₅ que du modèle d'EAE spontanée.

Conclusion: Nos données démontrent que les lymphocytes encéphalitogéniques produisant de l'IL-17 et présentant une capacité effectrice et migratoire marquée expriment MCAM. MCAM pourrait servir de biomarqueur en SEP et constituer une cible thérapeutique valable pour traiter les conditions neuroinflammatoires.

Mots-clés : sclérose en plaques, MCAM (CD146), Th17, Tc17, barrière hémato-encéphalique, encéphalomyélite auto-immune expérimentale, IL-23, transmigration leucocytaire, adhérence

Abstract

Objective: In multiple sclerosis (MS), pro-inflammatory lymphocytes use adhesion molecules to cross the blood-brain barrier (BBB) and accumulate in central nervous system (CNS) lesions. CD4 T lymphocytes polarized into auto-aggressive encephalitogenic TH17 (IL-17 secreting) are known to partake in MS lesion formation. Much less is known about the role of CD8 Tc17. Identification of specific surface markers and adhesion molecules expressed by TH17 and Tc17 lymphocytes would allow further characterization of these pathogenic subsets and would provide new therapeutic targets in MS.

Methodology: We identified MCAM in a proteomic screen of human BBB endothelial cells (ECs) and on a subset of T lymphocytes. We characterized the phenotype and function of MCAM-expressing cells *ex vivo*, *in vitro* and *in situ* using human and mouse material obtained from controls, MS subjects and Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) animals.

Results: MCAM is expressed by human BBB-ECs and by human effector memory CD161⁺ and CCR6⁺ T lymphocytes. Both CD4 and CD8 MCAM⁺ lymphocytes express more IL-17, IL-22, GM-CSF and Gz B than MCAM^{neg} lymphocytes. Moreover, MCAM is strikingly up-regulated in human on CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes during MS relapses, while treatment decreases MCAM expression. *In situ*, MCAM⁺ CD8 and CD4 T lymphocytes are present in perivascular infiltrates of MS and EAE CNS specimens, while MCAM expression is up-regulated on BBB-ECs within lesions. *In vitro*, MCAM⁺ CD8 T lymphocytes display higher killing capacity of oligodendrocytes, and MCAM blockade reduces CD8 Tc17 and CD4 TH17 transmigration across human BBB-ECs. *In vivo*, depletion of MCAM⁺ cells from reactivated CD4 T lymphocytes and from CD8 T lymphocytes decreases clinical symptoms in adoptive transfer EAE. Furthermore, expression of MCAM is up-regulated on CD4 and CD8 T lymphocytes in the TCR1640 transgenic mice, a model of spontaneous EAE. Finally, blocking MCAM in both MOG₃₅₋₅₅-induced and spontaneous primary progressive EAE attenuates chronic neurological deficits.

Conclusions: Our data demonstrate that encephalitogenic IL-17-producing lymphocytes with high effector and migratory capacity express MCAM, and that MCAM could serve as a

biomarker for MS and a valuable target for the treatment neuroinflammatory conditions.

Keywords : Multiple Sclerosis, MCAM (CD146), TH17, Tc17, blood-brain barrier, experimental autoimmune encephalomyelitis, IL-23, leukocyte transmigration, adhesion

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures.....	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xv
Introduction.....	1
Chapitre 1. La sclérose en plaques.....	2
1.1 Épidémiologie et manifestations cliniques.....	2
1.2 Pathologie.....	7
1.3 Facteurs de risque.....	12
1.3.1 Facteurs génétiques.....	12
1.3.2 Facteurs environnementaux.....	15
1.3.2.1 Facteurs infectieux.....	15
1.3.2.2 Facteurs hormonaux.....	16
1.3.2.3 Vitamine D.....	17
1.3.2.4 Tabagisme.....	18
1.3.2.5 Nutrition.....	19
1.4 Traitements.....	20
Chapitre 2. La barrière hémato-encéphalique.....	23
2.1 Composition de la BHE.....	23
2.2 Influence des péricytes et des astrocytes sur la BHE.....	26
2.3 La transmigration leucocytaire vers le SNC à travers la BHE.....	29
2.4 Plexus choroïdiens et vaisseaux méningés.....	31
Chapitre 3. Les populations lymphocytaires pro-inflammatoires en SEP.....	32
3.1 Modèles animaux.....	32
3.2 Activation des lymphocytes.....	33
3.3 Les sous-populations lymphocytaires CD4.....	34
3.3.1 TH1.....	35

3.3.2 TH17	36
3.3.3 TH2	37
3.3.4 Treg	37
3.4 Les sous-populations lymphocytaires CD8	38
3.5 Plasticité.....	40
Chapitre 4. Interaction des lymphocytes inflammatoires avec la BHE et le SNC en SEP	43
4.1 Cytokines	44
4.1.1 TNF	44
4.1.2 IFN- γ	45
4.1.3 IL-17	46
4.1.4 GM-CSF.....	47
4.1.5 GzB et perforine.....	48
4.2 Enzymes.....	48
4.3 Dérivés réactifs de l’oxygène (‘Reactive oxygen species’).....	50
Hypothèses et objectifs	52
Préambule	52
Hypothèse	53
Résultats : Manuscrit 1.....	55
Abstract.....	57
Introduction.....	58
Material and Methods	60
Results.....	69
Discussion.....	76
Table and figures.....	81
References.....	100
Résultats: Manuscrit 2.....	108
Abstract.....	110
Introduction.....	111
Material and methods.....	113
Results.....	121
Discussion.....	127

Figures.....	132
References.....	145
Discussion.....	156
Conclusion	171
Bibliographie.....	173

Liste des tableaux

Introduction	1
Tableau I. Échelle de prévalence globale de SEP	2
Manuscrit 1	55
Table 1: MCAM expression in TH1, TH2 and TH17 subsets.	81

Liste des figures

Introduction.....	1
Figure 1. Lésion démyélinisante de la matière blanche du SNC caractéristique de la SEP.....	7
Figure 2. Infiltrat périvasculaire du SNC en SEP	9
Figure 3 : Charte du risque de SEP chez les parents de différents degrés d'un patient atteint de la SEP et chez la population générale.....	12
Figure 4 : Les régions du génome démontrant une association avec la SEP... ..	14
Figure 5 : Les étapes de la transmigration leucocytaire du sang périphérique vers le SNC...28	
Figure 6: Représentation schématique de la pathophysiologie de la SEP.....	44
Figure 7: Effet des cytokines, 'reactive oxygen species' (ROS) et métalloprotéinases matricielles (MMPs) produites par les cellules immunitaires périphériques qui peuvent directement endommager les composantes de la BHE	51
Résultats: Manuscrit 1.....	55
Figure 1: Expression of MCAM in primary cultures of human BBB-ECs and <i>ex vivo</i> PBMCs.	82
Figure 2: IL-23-driven polarization induces MCAM expression on human CD4+CD45RO+ T lymphocytes, and MCAM+ lymphocytes preferentially express IL-17, GzB, IL-22 and GM-CSF, in addition to IFN- γ	84
Figure 3: MCAM is up-regulated on PBMCs and in the CNS of MS-affected subjects.	86
Figure 4: MCAM mediates IL-23-activated human memory lymphocyte adhesion and migration across BBB-ECs.	88
Figure 5: Administration of Fc-MCAM or depletion of MCAM+ lymphocytes limit the severity of MOG ₃₅₋₅₅ -induced EAE.....	90
Supplementary Figure 1: MCAM+ CD4+CD4RO+ T lymphocytes represent a subset of human effector memory T lymphocytes co-expressing ROR- γ , IL-23R, IL-17, GM-CSF and GzB, in addition to IFN- γ	92
Supplementary Figure 2: Expression of MCAM (red) and CD3 (green) in active MS lesions.....	94

Supplementary Figure 3: Expression of MCAM on CNS vessels and CD4 T lymphocytes of naive and EAE animals.	96
Supplementary Figure 4: Representative brain and spinal cord sections of MOG ₃₅₋₅₅ -immunized EAE animals stained with Luxol Fast Blue and H&E.	98
Résultats: Manuscrit 2	108
Figure 1: Acute relapses of MS are associated with increased frequency of MCAM ⁺ CD8 T lymphocytes.	131
Figure 2: MCAM expression on human circulating CD8 T lymphocytes is associated with an effector memory TC17/TC1 phenotype.	133
Figure 3: Activation induces MCAM expression by human CD8 ⁺ T lymphocytes exhibiting an inflammatory/cytotoxic phenotype.	135
Figure 4: Human CD8 ⁺ T lymphocytes use MCAM to migrate across the BBB, and MCAM ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes show an increased killing of oligodendrocytes <i>in vitro</i>	137
Figure 5: MCAM is up-regulated on CD8 ⁺ T lymphocytes during MOG-induced EAE and MCAM ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes contribute to disease severity and CNS infiltration.....	139
Figure 6: MCAM is up-regulated on CD8 ⁺ T lymphocytes from transgenic animals exhibiting spontaneous EAE and MCAM ⁺ CD8 ⁺ T lymphocytes contribute to chronic neurological disability in this model.	142
Supplementary Figure 1: MCAM expression is associated with expression of CD6, CD28, CD69, CD56 and CD253.	144

Liste des abréviations

ADN: acide désoxyribonucléique

APC: 'antigen presenting cell' ou cellule présentatrice d'antigène

ALCAM: 'activated leukocyte cell adhesion molecule'

BHE: barrière hémato-encéphalique

BOC: bandes oligoclonales

CFA: 'complete Freund's adjuvant'

EAE: encéphalite auto-immune expérimentale

EBV: virus Epstein-Barr

EDSS: 'expanded disability status scale'

EMMPRIN: 'extracellular métalloprotéinase matricielle protéique inducer'

FLAIR: 'fluid attenuated inversion recovery'

GFAP: 'glial fibrillary acidic protein'

GM-CSF: 'granulocyte-macrophage colony-stimulating factor'

GzB: granzyme B

ICAM-1: 'intercellular adhesion molecule-1'

IFN- γ : interféron gamma

IL: interleukine

IRM: imagerie par résonance magnétique

JCV: virus John Cunningham

LCR: liquide céphalo-rachidien

LFA-1: 'leukocyte function-associated antigen-1'

LMP: leucoencéphalopathie multifocale progressive

MBP : 'myelin basic protein'

MCAM : 'melanoma cell adhesion molecule'

MHCI: complexe majeur d'histocompatibilité classe I

MHCII: complexe majeur d'histocompatibilité classe II

MMP: métalloprotéinase matricielle protéique

MAG : 'myelin-associated glycoprotein'

MBP : 'myelin basic protein'

MOG : 'myelin oligodendrocyte glycoprotein'

miRNA: microARN

NCAM: 'neural cell adhesion molecule'

Neg: négatif

NK: 'Natural Killer'

OCT: 'optical coherence tomography'

PLP: protéine protéolipidique

PSGL-1: 'P-selectin glycoprotein ligand-1'

R: récepteur

ROS: 'Reactive Oxygen Species'

RR: risque relatif

SCI: syndrome clinique isolé

SNP : 'single nucleotide polymorphism'

SDMT: 'Symbol Digit Modalities Test score'

siRNA: 'small interfering RNA'

SEP: sclérose en plaques

TCR: 'T cell receptor'

Tc: T cytotoxiques

T_H: 'T helper'

TNF: 'tumor necrosis factor'

Treg: lymphocyte T régulateur

TEER: 'trans-endothelial electrical resistance' (résistance électrique trans-endothéliale)

UV: rayons ultra-violets

VLA-4: 'very late antigen-4'

À mes parents, ma sœur, Balulu et Mathieu

Remerciements

Ce projet et moi-même avons eu la chance d'être soutenus scientifiquement et personnellement par de nombreuses personnes formidables.

Je remercie le Dr Alexandre Prat, un superviseur exceptionnel qui fait grandir ses étudiants et qui par son enthousiasme, sa vivacité, son talent scientifique, clinique et d'enseignant, son engagement, son esprit d'équipe et sa générosité est un véritable modèle et une source d'inspiration. Je remercie également Dr Nathalie Arbour qui par son savoir, son ouverture, sa passion et son dévouement a été et continue d'être un mentor indispensable.

J'ai eu la chance de côtoyer des étudiants et des assistants de recherche hautement doués, motivés, patients et prêts à partager leur savoir et leur temps. Sans leur aide ce projet n'aurait évidemment simplement pas été envisageable. Un merci particulier à Dr Romain Cayrol qui a rendu ce projet possible par son intelligence, son flair et sa générosité. Merci à Dr Jorge Ivan Alvarez, Dr Igal Ifergan et Dr Hania Kebir d'avoir partagé leurs dons et connaissances hors du commun. Merci à Marc-André Lécuyer pour son aide essentielle, son intelligence et sa débrouillardise, ainsi qu'à Olivia Saint-Laurent et Marc Charabati pour toute leur aide. Je remercie également tous les autres étudiants passés et présents des labos Prat et Arbour. Je tiens également à souligner la contribution majeure de Simone Terouz, Sandra Larouche, Diane Beauseigle, Dr Camille Pittet et tout spécialement Lyne Bourbonnière, votre expertise, votre volonté et votre support ont été cruciaux pour mener ce projet à terme.

Ce PhD n'aurait jamais été entrepris sans l'appui et les conseils du Dr Pierre Duquette et ceux du Dr Jack Antel, que je remercie sincèrement, ainsi que tous les membres de la clinique SEP et ceux du département de neurologie du CHUM, en particulier Josée Poirier, Dr Céline Jobin, Dr Marc Girard, Dr Gilles Bernier, Dr Alexandre Prat et Dr Pierre Duquette.

J'ai eu la chance d'être soutenue et encouragée par parents et amis. Je tiens à remercier spécialement Andrée, Annie, Camille, Josée et Véronique de leur présence et leur support. Ma sœur Marie-Hélène et mes parents Diane et Jacques ont de tout temps été à la fois des sources de réconfort et de conseils, des rocs sur lesquels s'appuyer et des modèles que j'admire. Je tiens finalement à remercier Mathieu Paradis pour son apport unique et de tous les instants.

Introduction

En 1868, à Paris, Charcot publie un article décrivant une nouvelle entité clinique qu'il nomme sclérose en plaques (SEP)(Charcot 1868). En pathologie, il observe des plaques de démyélinisation au niveau du système nerveux central (SNC), qui se traduisent en clinique par des symptômes neurologiques récurrents, variés et intermittents. En 1942, Elvin A. Kabat décrit la présence d'une proportion augmentée d'immunoglobulines gamma dans le LCR des patients atteints de SEP, et souligne que la présence et la persistance de ces bandes oligoclonales (BOC) peuvent faciliter le diagnostic de SEP (Kabat, Moore et al. 1942). Dans les années 1980, l'imagerie du SNC par résonance magnétique (IRM) est introduite puis devient largement accessible, une avancée majeure pour le diagnostic et le suivi de la SEP (Paty, Oger et al. 1988, Barkhof, Filippi et al. 1997, McDonald, Compston et al. 2001). En 1995, un premier traitement immunomodulateur permettant de diminuer les manifestations cliniques et radiologiques de la SEP est introduit au Canada (1993, Paty and Li 1993). En 2014, dix traitements modulateurs sont approuvés pour traiter la SEP au Canada. Toutefois, bien que les symptômes de la SEP soient attribués à une action inappropriée du système immunitaire au sein du SNC entraînant la formation de lésions caractérisées par une perte de myéline et d'axones, la cause exacte de la SEP demeure inconnue. La question demeure à savoir si l'entrée de cellules immunitaires périphériques dans le SNC, normalement restreinte par la présence de la barrière hémato-encéphalique (BHE), constitue l'événement initial ou un phénomène secondaire à une dysfonction du compartiment central (Stys, Zamponi et al. 2012). Néanmoins, l'accroissement constant des connaissances concernant les mécanismes moléculaires sous-tendant l'infiltration du SNC par des leucocytes inflammatoires a permis de nombreuses avancées tant au niveau de la compréhension de la pathophysiologie de la SEP que du traitement pharmacologique de ses manifestations cliniques. Dans l'introduction, une revue des connaissances actuelles concernant la SEP, la BHE, les populations lymphocytaires pro-inflammatoires et l'interaction de ces populations lymphocytaires avec la BHE et le SNC en SEP sera présentée.

Chapitre 1. La sclérose en plaques

1.1 Épidémiologie et manifestations cliniques

La SEP est une maladie démyélinisante et neurodégénérative idiopathique du SNC, causant des signes et symptômes neurologiques attribuables à des lésions inflammatoires disséminées dans l'espace et dans le temps, sans explication alternative (Poser, Paty et al. 1983, Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, Polman, Reingold et al. 2011). Globalement, la prévalence de la SEP augmente en fonction de la distance avec l'équateur, avec certaines exceptions notables, reflétant l'influence de facteurs génétiques et environnementaux (Ebers and Sadovnick 1993, O'Gorman, Lucas et al. 2012, Trojano, Lucchese et al. 2012, Evans, Beland et al. 2013, Wade 2014). La prévalence de la SEP au Canada se trouve parmi les plus élevées à l'échelle mondiale. Des méta-analyses rapportent une prévalence mondiale maximale en Alberta (350 cas/100 000). Au Québec, la prévalence est de 180/100 000, donc près d'un Québécois sur 500 sera affecté (Tableau I) (Evans, Beland et al. 2013, Wade 2014).

Prévalence	cas/100 000	Pays
Très élevée	170-350	Canada, Écosse, Irlande (majeure partie), Suède (Varmland), Finlande (Seinäjoki et Vaasa)
Élevée	70-170	États-Unis (majeure partie), Norvège, Suède (Västerbotten), Danemark, Finlande (Uusimaa), Islande, Angleterre, Irlande (Wexford), Allemagne, Autriche, Suisse, Belgique, Italie, Turquie, Slovénie, Croatie, République Tchèque, Luxembourg, Pays-Bas
Moyenne	38-70	Sud des États-Unis, Russie, Australie en majeure partie, sud de la Nouvelle-Zélande, Îles Féroé, Pologne, Estonie, Espagne, Grèce, Hongrie, Serbie et Monténégro, Bulgarie, Bélarus, Israël, Lettonie, Lituanie, Moldavie, Portugal, Ukraine
Faible	13-38	Australie (Queensland), nord de la Nouvelle-Zélande, Kazakhstan, Roumanie, Inde, Jordanie, Arabie Saoudite, Martinique, Argentine, Afrique du Sud, Brésil, Bahreïn, Barbade, Liban, Malte, Maroc, Slovaquie, Tunisie, Émirats, Uruguay
Très faible	0-13	Japon, Mexique, Chine, Taïwan, Malaisie, Thaïlande, Koweït, Panama, Colombie, Afghanistan, Algérie, Cameroun, Chili, Costa Rica, Cuba, Équateur, Guatemala, Guinée, Honduras, Irak, Malawi, Mongolie, Nicaragua, Nigéria, Paraguay, Pérou, Qatar, République de Corée, Singapour, Bénin, Sénégal

Tableau I : Échelle de prévalence globale de SEP (adapté avec permission de (Wade 2014))

La SEP dans sa forme cyclique compte pour 80-90% des présentations initiales, la forme primaire progressive constituant environ 10-20% des cas (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, Palace 2001, Antel, Antel et al. 2012, Runia, van Pelt-Gravesteijn et al. 2012). La forme cyclique de la SEP présente une croissante prédominance féminine, le ratio femme : homme (F : H) pouvant maintenant atteindre 4.55 dans les latitudes entre le 45^e et le 83^e degré nordique (Poppe, Wolfson et al. 2008, Ramagopalan, Byrnes et al. 2010, Trojano, Lucchese et al. 2012). La forme primaire progressive présente au contraire un ratio F : H stable autour de 1.0 (Trojano, Lucchese et al. 2012). L'âge moyen au début des symptômes est en général entre 20 et 50 ans. La forme cyclique, dont 5% des cas débutent avant l'âge de 16 ans, se présente en général une décade plus tôt que la forme progressive primaire (Antel, Antel et al. 2012, Runia, van Pelt-Gravesteijn et al. 2012, Inaloo and Haghbin 2013).

Dans la forme cyclique, les premiers symptômes surviennent dans le cadre d'une poussée. Une poussée de SEP est définie comme le développement de symptômes neurologiques causés par une lésion inflammatoire démyélinisante, durant au moins 24h, objectivable à l'examen ou rapportée à l'histoire, en l'absence de fièvre ou d'infection (Polman, Reingold et al. 2011). En général, les déficits s'installent sur quelques heures à quelques jours, atteignent leur pic en deux semaines et persistent pour 1-2 semaines avant de s'améliorer (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, Palace 2001). La récupération suivant une poussée est très variable, une récupération incomplète étant associée avec un pronostic plus sombre à long terme (Freedman, Selchen et al. 2013). Toute manifestation clinique secondaire à une atteinte du SNC est théoriquement possible, mais les signes et symptômes les plus fréquemment rencontrés lors du premier épisode de poussée de SEP, qu'on peut également appeler dans ce contexte syndrome clinique isolé (SCI), sont la névrite optique (causant un déficit visuel monoculaire avec perte de saturation des couleurs), la myélite transverse (causant des symptômes sensitifs avec niveau variable et/ou une atteinte motrice et/ou sphinctérienne) et les atteintes isolées du tronc cérébral (causant des anomalies des mouvements extra-oculaires et/ou de la sensation dans le territoire du trijumeau et/ou une atteinte vestibulaire ou cérébelleuse). Une atteinte polysymptomatique est également possible (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, Palace 2001). Les poussées surviennent en moyenne tous les 18-24 mois, et plus fréquemment dans les premières années d'évolution.

Le signe de Lhermitte (paresthésies irradiant dans les membres à la flexion de la nuque) et le phénomène d'Uhthoff (aggravation réversible des symptômes à l'exercice ou à la chaleur) peuvent être retrouvés au questionnaire chez les patients présentant une SEP cyclique, mais également dans la forme primaire progressive (PP-SEP) et la forme secondairement progressive (conversion de la forme cyclique à la forme progressive, survenant chez 44% des SEP cyclique après 10 ans et chez 61% après 20 ans d'évolution de la maladie) (Scalfari, Neuhaus et al. 2014). Les formes progressives de la SEP débutent de façon insidieuse et en général à un âge plus avancé que la SEP cyclique. La présentation clinique prédominante est celle d'une atteinte spinale progressive avec trouble de la démarche (paraparésie spastique évolutive, atteinte sensitive d'abord aux membres inférieurs, atteinte vésicale et sphinctérienne) (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, Palace 2001, Antel, Antel et al. 2012).

Parmi les manifestations de la SEP cyclique et progressive les plus débilantes sont la fatigue, la dépression et l'atteinte cognitive. Ces manifestations ne sont que faiblement prises en compte par l'outil de mesure de progression en SEP le plus répandu, l'Expanded Disability Status Scale (EDSS). Pourtant, la fatigue est rapportée par 75% des patients, affectant significativement la qualité de vie et limitant les activités physiques, sociales et professionnelles (Braley and Chervin 2010, Krupp, Serafin et al. 2010). En-dehors de la fatigue (Hildebrandt and Eling 2014), jusqu'à 50% des patients atteints de SEP présenteront un épisode de dépression majeure, soit 3 fois plus que la population générale (Feinstein 2011). Le risque suicidaire est également plus élevé chez les patients SEP que dans la population générale (Feinstein 2011). Les atteintes du comportement sont également fréquentes en SEP, l'agressivité, l'apathie, l'euphorie et le manque d'autocritique étant des symptômes plus fréquemment retrouvés chez les sujets souffrant de SEP que chez les contrôles (Rosti-Otajarvi and Hamalainen 2013). Bien que négligée durant plusieurs années, l'atteinte cognitive fait maintenant partie des priorités en SEP (Freedman, Selchen et al. 2013). Après dix ans d'évolution, plus de la moitié des patients présenteraient une atteinte cognitive objectivable (Lovera and Kovner 2012). Une étude récente rapporte qu'une poussée cognitive isolée (objectivée par un déclin à l'évaluation des fonctions cognitives) est associée à une performance cognitive plus faible au long cours, sans être toutefois subjectivement reconnue par le patient et sans être associée à des changements d'humeur ou de fatigue. Ceci souligne

l'importance de l'activité de la maladie sur l'atteinte cognitive et la nécessité de rechercher les poussées cognitives isolées pour évaluer l'efficacité des traitements disponibles (Freedman, Selchen et al. 2013, Pardini, Uccelli et al. 2014). La capacité des traitements immunomodulateurs à freiner l'atteinte cognitive demeure en effet toujours à démontrer (Lovera and Kovner 2012, Freedman, Selchen et al. 2013).

Les critères diagnostiques actuels de la SEP cyclique et primaire progressive tiennent compte des manifestations cliniques mais également paracliniques de la SEP, soit la présence de lésions caractéristiques à l'IRM et de BOC à l'analyse du LCR, afin de remplir les critères de dissémination dans le temps et dans l'espace (Polman, Reingold et al. 2011). L'IRM permet d'accélérer le diagnostic de SEP en présence d'un premier épisode de symptômes cliniques compatibles (SCI) et de lésions caractéristiques à l'IRM. La présentation radiologique classique de la SEP est caractérisée par la présence de multiples lésions de la matière blanche hyperintenses en séquence T2 et en 'fluid attenuated inversion recovery' (FLAIR). Ces lésions ont une distribution périventriculaire et juxta-corticale au niveau cérébral, avec fréquente atteinte du corps calleux en 'doigts de Dawson'. En infra-tentoriel, on les retrouve au niveau du tronc cérébral et du cervelet. Au niveau de la moelle, on retrouve des lésions courtes (moins de 3 segments), souvent prédominantes au niveau cervical (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, Palace 2001). Après l'injection de gadolinium, certaines de ces lésions peuvent rehausser en général pour 4-6 semaines, ce qui dénote un bris de la BHE et témoigne d'une lésion active (Palace 2001, Traboulsee and Li 2006). Les critères radiologiques de dissémination dans le temps et l'espace peuvent permettre de poser un diagnostic de SEP après une seule première poussée et de prédire le risque d'évolution d'un syndrome clinique isolé vers la SEP. La présence d'une lésion asymptomatique à l'IRM est associée à un risque de plus de 80% d'évoluer vers une SEP à 10 ans, alors que l'absence de lésion est associée à un risque de moins de 20% (O'Riordan, Thompson et al. 1998, Palace 2001). L'utilisation croissante de l'IRM a mené à la découverte fortuite chez des sujets asymptomatiques de lésions similaires à celles retrouvées chez les SCI ou chez les patients SEP. En l'absence de manifestations cliniques passées ou présentes compatibles avec la SEP, ces patients seront considérés comme des syndromes radiologiques isolés, une entité qui pourrait dans certains cas représenter un état pré ou sub-clinique de la SEP. De ces patients, environ un tiers

progresseront cliniquement vers une SEP à 5 ans et un autre tiers montrera une progression radiologique. La présence de lésion(s) cervicale(s) semble le meilleur prédicteur d'un risque élevé de conversion clinique. La prise en charge de ces patients est encore à l'étude (Okuda, Mowry et al. 2009, Granberg, Martola et al. 2013).

L'atteinte radiologique n'est pas le seul examen paraclinique utile en SEP. L'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR) à la recherche de BOC, présentes chez près de 90% des patients (Dobson, Ramagopalan et al. 2013), participe aux critères de dissémination dans l'espace (Polman, Reingold et al. 2011). Chez les SCI, la présence de BOC est associée à un risque 9 fois plus élevé de développer la SEP (Dobson, Ramagopalan et al. 2013). De plus, l'analyse du LCR permet d'exclure certaines alternatives diagnostiques. Bien qu'en déclin, l'utilisation des potentiels évoqués visuels permet de dépister des atteintes subcliniques du nerf optique (Beer, Rosler et al. 1995). D'autres techniques sont en développement, entre autres 'l'optical coherence tomography' (OCT), afin d'estimer la perte neuronale de façon non invasive et rapide (Fernandez, Arnal-Garcia et al. 2013, Di Maggio, Santangelo et al. 2014, Narayanan, Cheng et al. 2014).

1.2 Pathologie

La pathologie de la SEP a longtemps été dominée par l'étude des plaques de démyélinisation retrouvées au niveau de la matière blanche du SNC (Figure 1) (Lassmann 2013).

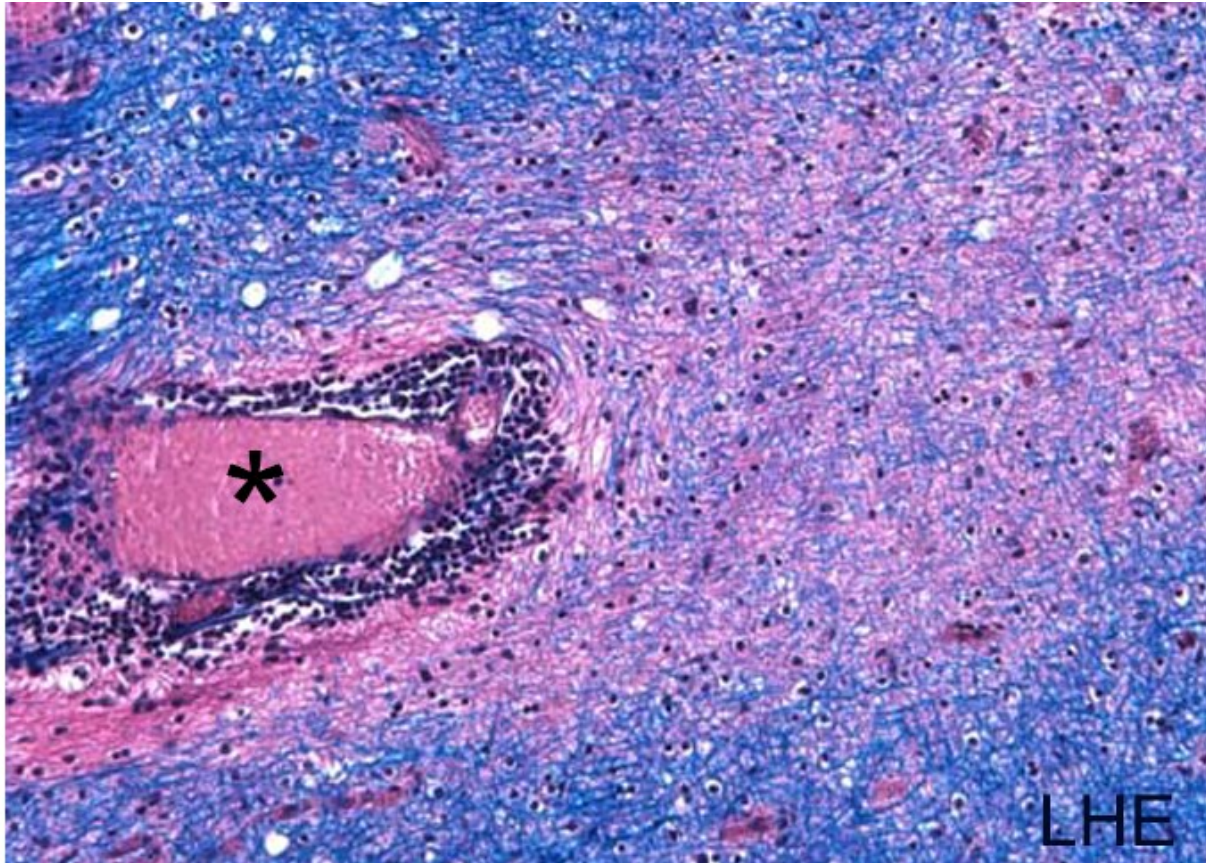


Figure 1 : Lésion démyélinisante de la matière blanche du SNC caractéristique de la SEP.

La coloration avec Luxol Fast Blue de la myéline (bleu) démontre une zone de perte de myéline en halo autour d'un vaisseau (lumen identifié par un astérisque) entouré d'un infiltrat cellulaire (violet) mis en évidence par la coloration à l'hématoxyline et à l'éosine. Échantillon de tissu cérébral post-mortem de sujet atteint de la SEP. Adapté avec permission (Larochelle, Cayrol et al. 2012).

Ces plaques 'classiques' de SEP sont caractérisées par une perte de la gaine de myéline, une gliose réactionnelle et une dysfonction focale de la BHE, associées à des infiltrats immunitaires périvasculaires (Figures 1 et 2) (Sospedra and Martin 2005, Hu and

Lucchinetti 2009). Elles sont corrélées à l'imagerie par des anomalies de signal caractéristiques, et peuvent se traduire cliniquement par des poussées. La démyélinisation est secondaire au dommage que subissent les oligodendrocytes, les cellules responsables de la synthèse de la myéline au niveau du SNC. Les protéines de myéline les plus abondantes dans le SNC sont la 'myelin basic protein' (MBP), la protéine protéolipidique (PLP, isoforme longue exclusivement exprimée dans le SNC), la 'myelin oligodendrocyte glycoprotein' (MOG, exclusivement exprimée dans le SNC) et la 'myelin associated glycoprotein' (MAG) (Bradl and Lassmann 2010). Des macrophages et des microglies activées sont en général retrouvés à proximité des zones de destruction de la myéline et des vésicules contenant des débris de myéline phagocytés sont retrouvées dans leur cytoplasme. La déposition d'anticorps, l'activation du complément, l'apoptose et la nécrose ont été décrits comme mécanismes sous-tendant la perte de myélinisation par les oligodendrocytes en SEP (Lucchinetti, Bruck et al. 2000, Lassmann 2014). La remyélinisation est possible, entre autres à partir de la maturation de cellules progénitrices d'oligodendrocytes, et observée de façon variable d'un individu à l'autre et d'une plaque à l'autre, se traduisant probablement cliniquement par une récupération plus ou moins complète après une poussée. L'environnement inflammatoire, le manque de facteurs trophiques, les débris de myéline, la perte axonale et le dommage mitochondrial sont des facteurs pouvant nuire à la migration, la différenciation et la maturation des précurseurs d'oligodendrocytes et ainsi limiter la remyélinisation (Bradl and Lassmann 2010, Brosnan and Raine 2013, Lassmann 2013, Kutzelnigg and Lassmann 2014, Lassmann 2014). Les astrocytes intra et péri-lésionnels démontrent une augmentation de leur taille et de leur contenu en GFAP, peuvent rétracter leurs pieds astrocytaires et produire des cytokines pro-inflammatoires. Bien que le support des astrocytes soit essentiel à la remyélinisation, la formation d'une 'cicatrice' astrogliale à l'inverse nuit à ce processus (Brosnan and Raine 2013, Lassmann 2014).

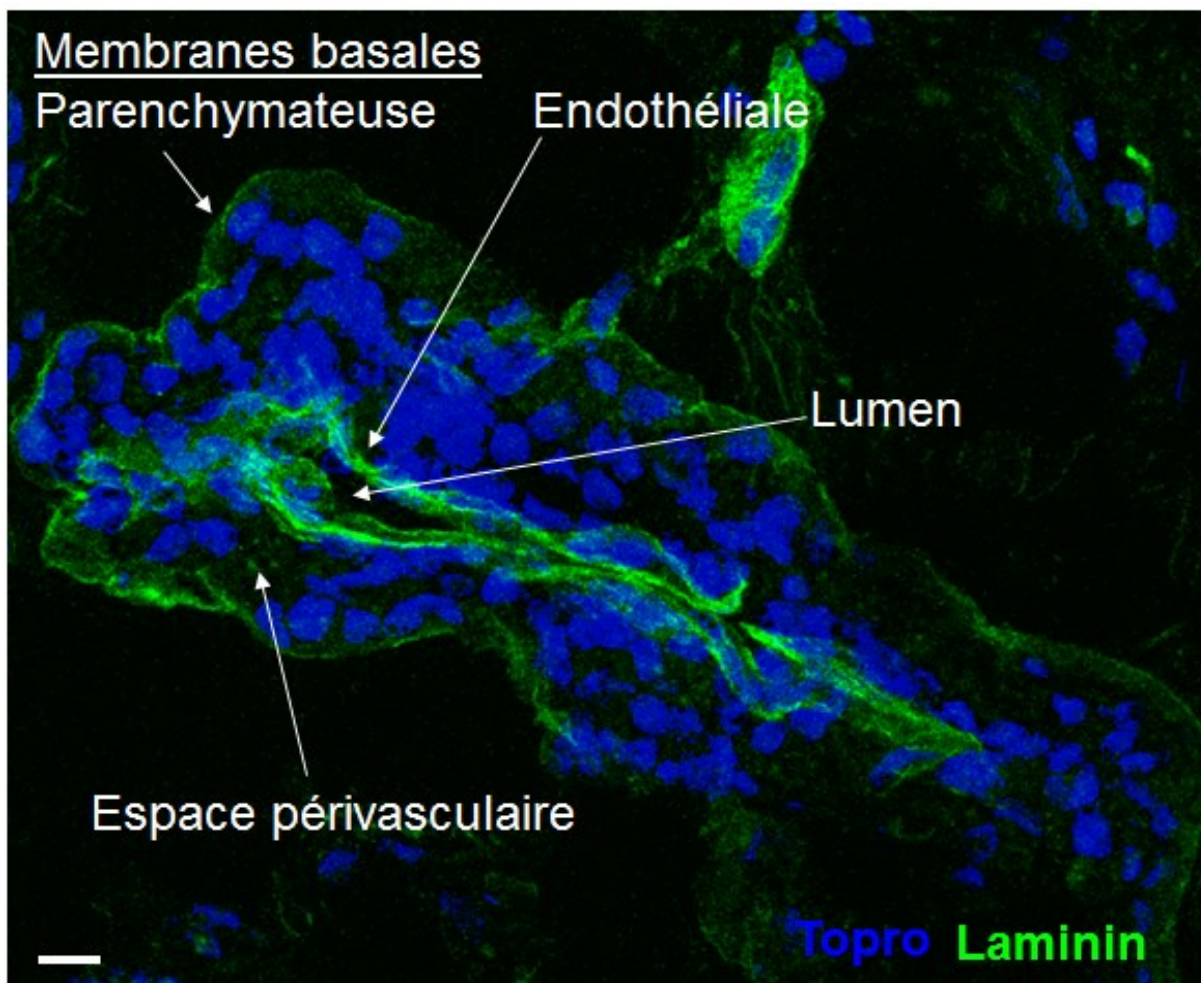


Figure 2 : Infiltrat périvasculaire du SNC en SEP.

L'espace périvasculaire, compris entre les lames basales endothéliales et parenchymateuses (en vert), est envahi par de nombreuses cellules infiltrantes (en bleu). Immunohistofluorescence sur échantillon de tissu cérébral post-mortem de sujet atteint de la SEP. Marquage des membranes basales avec un anticorps anti-laminine (vert) et marquage des noyaux cellulaires avec Topro (bleu). Barre d'échelle = 10 um. Non publié.

Plus difficilement objectivables en imagerie, l'atteinte diffuse de la matière blanche dite d'apparence normale, la présence de plaques corticales et l'importante atteinte axonale et neuronale n'ont été que plus récemment étudiées systématiquement, bien qu'elles sous-tendent probablement les déficits cumulatifs progressifs associés à la SEP (Peterson, Bo et al. 2001,

Kutzelnigg, Lucchinetti et al. 2005, Dutta and Trapp 2007, Zivadinov and Minagar 2009). L'activation diffuse et chronique de la microglie en-dehors des lésions est associée au stress oxydatif au sein de la matière blanche d'apparence normale. Des plaques de démyélinisation corticale peuvent être observées en plus des plaques périventriculaires et sous-corticales 'classiques', en particulier des plaques subpiales qui seraient spécifiques à la SEP. Les plaques corticales tendent à présenter un degré de remyélinisation supérieur aux plaques sous-corticales, bien que les neurones endommagés et ne présentant pas d'activité électrique ne soient plus résistants à l'attaque du système immunitaire et ne soient pas remyélinisés (Friesse and Fugger 2005, Bradl and Lassmann 2010, Lassmann 2014). La dysfonction mitochondriale neuronale secondaire au stress oxydatif chronique serait responsable au moins partiellement du dommage axonal et neuronal observé en SEP, en particulier au niveau des axones de petit calibre (Lassmann 2014).

Une classification basée sur l'âge des lésions est souvent utilisée, les lésions actives étant définies par la présence d'inflammation lymphocytaire et l'infiltration marquée de macrophages ayant phagocyté des débris de myéline. Les lésions chroniques actives sont définies par un centre inactif, entouré par un anneau d'activation microgliale et de macrophages, dont certains contiennent des débris de myéline, avec une atteinte axonale variable. Les plaques inactives consistent en des zones bien définies de perte de myéline sans bordure active (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, Frohman, Racke et al. 2006, Lassmann 2013).

L'infiltration du SNC par des leucocytes inflammatoires semble présider la formation des lésions en SEP. Ces leucocytes infiltrants relâchent des facteurs toxiques et des molécules inflammatoires qui activent et endommagent les cellules résidentes du SNC (Dutta and Trapp 2007, Goverman 2009). Différentes sous-populations leucocytaires ont été incriminées dans la formation des lésions en SEP; la contribution des lymphocytes T_{Helper} (T_H), des lymphocytes T_{cytotoxiques} (T_C), des macrophages, des cellules dendritiques et des lymphocytes B sont parmi les plus étudiées en SEP (Sospedra and Martin 2005, Bhat and Steinman 2009, Goverman 2009, Hu and Lucchinetti 2009, Lassmann 2013). Pour être pathogéniques, les cellules immunitaires pro-inflammatoires doivent d'abord entrer dans le SNC, normalement protégé de l'invasion de cellules périphériques par la BHE (Laroche, Alvarez et al. 2011). L'activation

et la déstabilisation de la BHE, permettant l'infiltration périvasculaire de leucocytes au niveau du SNC, sont en effet considérées comme des événements précédant la formation des lésions de SEP, qui seront revus plus en détail dans les sections suivantes. Le fréquent rehaussement des lésions actives après injection de gadolinium (Grossman, Braffman et al. 1988, Bruck, Bitsch et al. 1997, Gaitan, Shea et al. 2011) et la diminution de l'incidence de nouvelles lésions avec les traitements immunomodulateurs (Polman, O'Connor et al. 2006, Rio, Rovira et al. 2008, Kappos, Radue et al. 2010) supportent le rôle crucial en SEP de cette transmigration leucocytaire à travers la BHE.

1.3 Facteurs de risque

1.3.1 Facteurs génétiques

L'incidence de SEP est augmentée chez les proches parents de patients SEP, soulignant l'importance des facteurs génétiques. Pour le jumeau homozygote d'un patient SEP, le risque de développer la maladie est de 18.3%; pour le jumeau dizygote près de 5%; pour le reste de la fratrie 2.7% (Figure 3)(O'Gorman, Lin et al. 2013).

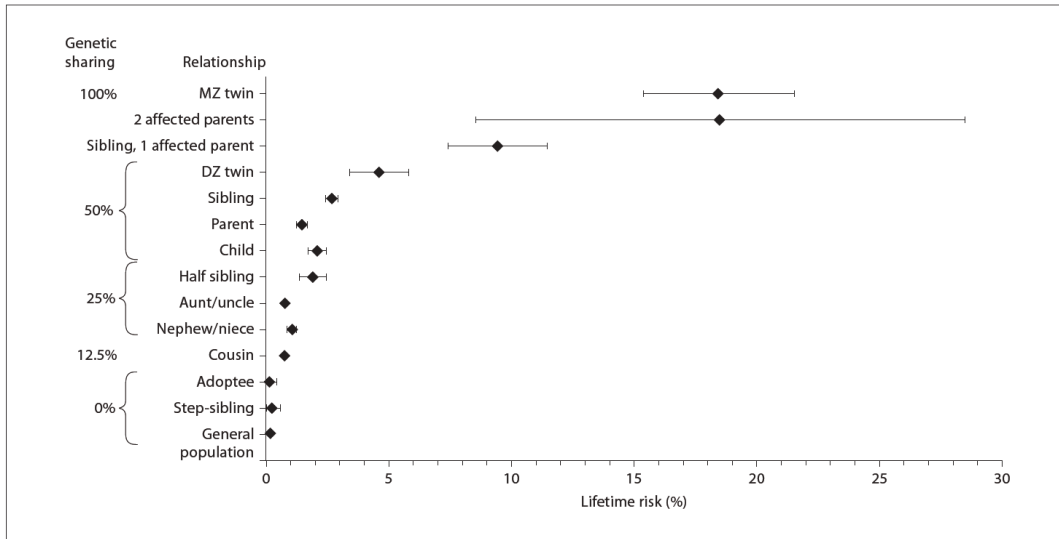


Figure 3 : Charte du risque de SEP chez les parents de différents degrés d'un patient atteint de la SEP et chez la population générale. Reproduit avec permission (O'Gorman, Lin et al. 2013)

Les facteurs génétiques associés au risque de développer la SEP sont majoritairement impliqués dans la fonction immunitaire, le facteur génétique associé au plus grand effet sur la susceptibilité (risque relatif autour de 3.08) étant l'haplotype Human Leukocyte Antigen (HLA)-DR, associé au complexe majeur d'histocompatibilité (MHC) classe II (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, International Multiple Sclerosis Genetics, Hafler et al. 2007, International Multiple Sclerosis Genetics, Wellcome Trust Case Control et al. 2011, Gourraud, Harbo et al. 2012, O'Gorman, Lucas et al. 2012). Le MHC classe II est impliqué dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes CD4. La présence de l'allèle HLA-DRB1*1501 est associée avec un risque plus élevé de développer la SEP suite à un premier épisode démyélinisant dans la population pédiatrique canadienne (Banwell, Bar-Or et al. 2011).

Différentes allèles du MHC classe I, impliqué dans la présentation d'antigènes aux lymphocytes CD8, ont également démontré un effet protecteur ou délétère en SEP. Dans une analyse récente, la 'Genome Wide Association Study', plusieurs autres gènes hors du MHC ont été identifiés ou confirmés comme influençant la susceptibilité à développer la SEP. La majorité de ces gènes est associée à la fonction immunitaire des lymphocytes, entre autres leur activation, la production de cytokines, l'adhérence/migration et la signalisation (Figure 4) (International Multiple Sclerosis Genetics, Wellcome Trust Case Control et al. 2011).

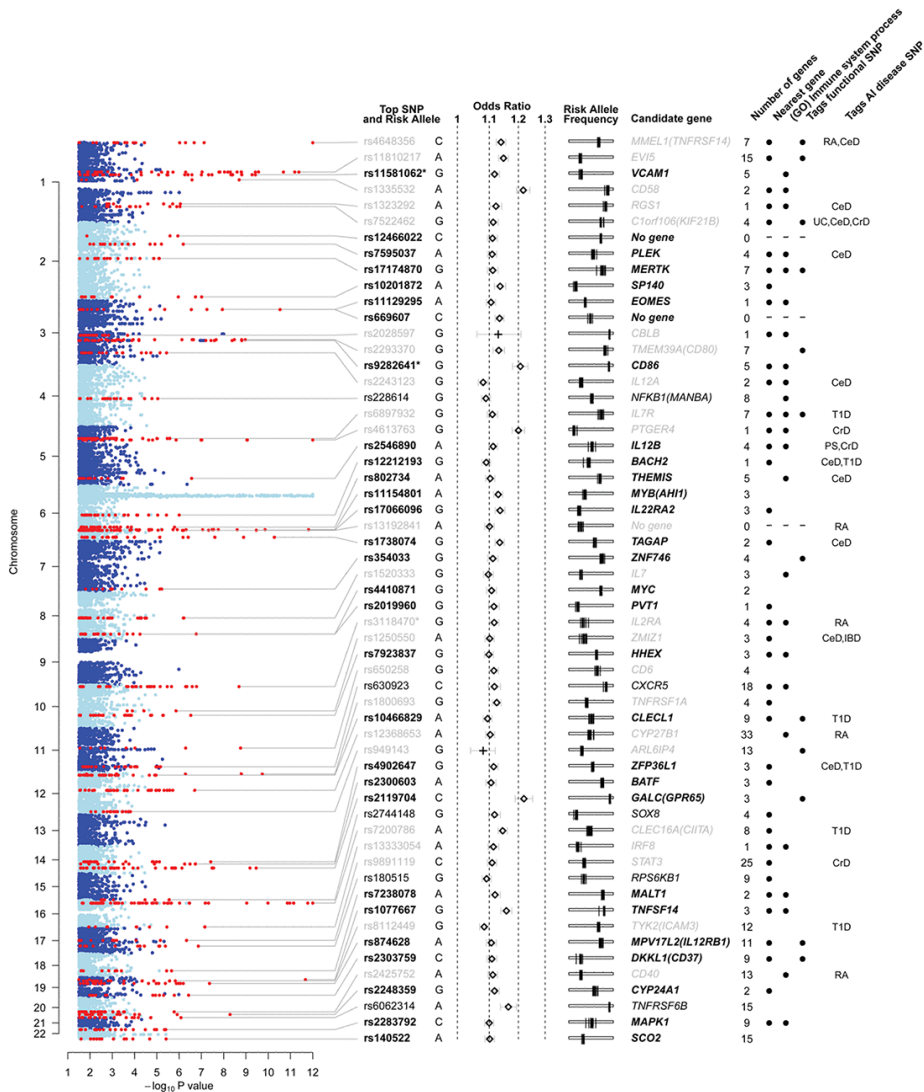


Figure 4 : Les régions du génome démontrant une association avec la SEP. Colonnes de droite: pour chaque région d'association, lorsque possible un gène candidat est donné. Les points noirs indiquent que le gène candidat est physiquement le gène le plus proche inclus dans le 'processus du système immunitaire Gene Ontology term'. La colonne finale indique quels 'single nucleotide polymorphisms' (SNPs) sont corrélés avec les SNPs rapportés comme associés à d'autres maladies auto-immunes (AI) comme l'arthrite rhumatoïde (RA), la maladie coeliaque (CeD), la colite ulcéreuse (UC), la maladie de Crohn (CrD), le diabète de type 1 (T1D) et le psoriasis (PS). Adapté avec permission (International Multiple Sclerosis Genetics, Wellcome Trust Case Control et al. 2011).

1.3.2 Facteurs environnementaux

En-dehors de la prévalence nettement plus élevée de la SEP dans les latitudes nord et sud situées entre 45 et 65 degrés par rapport à l'équateur (Trojano, Lucchese et al. 2012, Wade 2014), un des principaux arguments en faveur de l'influence de l'environnement sur le développement de la SEP provient d'études chez les immigrants. En effet, les sujets originaires de régions à faible risque voient leur risque augmenter suite à l'établissement dans une région à risque élevé, si cette migration s'effectue avant l'âge de 15 ans. À l'inverse, passer d'une zone géographique à risque élevé à une zone de risque moindre avant l'âge de 15 ans est associé à une réduction du RR pour la SEP (Gale and Martyn 1995, Dean and Elian 1997, Kennedy, O'Connor et al. 2006, Kurtzke 2013). Tout comme pour le lieu de résidence, d'autres facteurs environnementaux reconnus comme facteurs de risque en SEP semblent exercer leur effet principal durant l'enfance et l'adolescence. En parallèle, certains facteurs environnementaux influencent le cours de la maladie chez les patients déjà atteints de SEP. Dans cette section, les principaux facteurs de risques environnementaux seront revus. Leur impact potentiel sur le système immunitaire et le SNC sera brièvement exposé.

1.3.2.1 Facteurs infectieux

L'activation inappropriée du système immunitaire dirigée contre le SNC, l'augmentation des poussées autour des infections virales (Sibley, Bamford et al. 1985) et les occurrences 'd'épidémies' de SEP suggèrent la participation d'un agent infectieux au développement de la SEP (Kurtzke 2013). Le virus Epstein-Barr (EBV) est le plus étudié en relation avec la SEP. Premièrement, près de 100% des patients atteints de la SEP sont séropositifs pour ce virus, alors que la séronégativité pour l'EBV réduit considérablement le risque de développer la SEP (Lucas, Hughes et al. 2011, O'Gorman, Lucas et al. 2012, Koch, Metz et al. 2013, Pakpoor, Disanto et al. 2013). Deuxièmement, une histoire de mononucléose infectieuse, qui survient lorsque la primo-infection par l'EBV survient après l'enfance, est significativement associée au risque de développer la SEP (Handel, Williamson et al. 2010). Troisièmement, chez les enfants présentant un épisode démyélinisant isolé, bien que non essentielle, la séropositivité pour l'EBV est associée à un risque accru d'évoluer vers un

diagnostic de SEP (Banwell, Bar-Or et al. 2011, O'Gorman, Lucas et al. 2012, Pakpoor, Disanto et al. 2013). L'infection et en particulier l'âge à l'infection par l'EBV semblent donc associés au risque de développer la SEP, bien que les mécanismes impliqués dans cette association soient toujours nébuleux (O'Gorman, Lucas et al. 2012).

À l'opposé de l'EBV, l'infection par des parasites aurait un effet anti-inflammatoire, entraînant une modulation du phénotype des cellules dendritiques, qui via une diminution de l'expression de molécules de co-stimulation et de cytokines pro-inflammatoires vont entraîner une augmentation de la population des lymphocytes T régulateurs (Treg) (Kuijk, Klaver et al. 2012, Thome, Issayama et al. 2014). En SEP, l'infection par des parasites intestinaux serait associée à une diminution des poussées et de la formation de nouvelles lésions (Correale and Farez 2007, Correale, Farez et al. 2008, Correale and Farez 2011, Fleming, Isaak et al. 2011, Koch, Metz et al. 2013).

1.3.2.2 Facteurs hormonaux

La prédominance féminine en SEP cyclique suggère fortement une influence hormonale (Jobin, Larochelle et al. 2010, Miller, Fazekas et al. 2014). La franche réduction du risque de poussée durant le deuxième et le troisième trimestre de grossesse chez les femmes SEP pointe également vers un rôle des oestrogènes dans la modulation de l'expression de la maladie (Confavreux, Hutchinson et al. 1998, Ramagopalan, Yee et al. 2012), bien que l'administration d'estriol exogène ne modifie pas le risque de poussée en post-partum (Miller, Fazekas et al. 2014). De plus, l'utilisation d'hormones pour augmenter la fertilité augmente l'activité clinique et radiologique en SEP (Michel, Foucher et al. 2012). Des études préliminaires suggèrent que l'utilisation d'oestrogènes pourrait potentiellement diminuer l'activité de la maladie chez les femmes alors que l'administration de testostérone pourrait diminuer l'atrophie cérébrale chez les hommes (Miller, Fazekas et al. 2014). L'impact positif ou négatif de l'utilisation de contraceptifs oraux est encore à clarifier (D'Hooghe M, Haentjens et al. 2012, Sena, Couderc et al. 2012, Bove and Chitnis 2014, Bove, Musallam et al. 2014). Le sexe et le genre interagissent avec d'autres facteurs de risque de SEP comme la transmission d'allèles MHC classe II, les niveaux sériques de vitamine D et les habitudes de vie comme le tabagisme (Bove and Chitnis 2014).

1.3.2.3 Vitamine D

Non seulement la prévalence de la SEP augmente en fonction de la distance avec l'équateur, mais l'exposition au soleil est également liée au risque de développer la SEP (Acheson, Bachrach et al. 1960, Ebers and Sadovnick 1993, Freedman, Dosemeci et al. 2000, Ramagopalan, Handel et al. 2011). Bien que remis en question en 2013 (Fiddes, Wason et al. 2013, Hintzen 2013), le mois de naissance pourrait influencer le risque de développer la SEP, avec pour l'hémisphère nord une augmentation du risque pour les naissances en avril-mai et une diminution pour les naissances en novembre (Dobson, Giovannoni et al. 2013), l'inverse étant observé dans l'hémisphère sud (Staples, Ponsonby et al. 2010). L'exposition (maternelle ou personnelle) aux rayons ultra-violet (UV) est proposé comme mécanisme sous-tendant une telle association (Hayes, Cantorna et al. 1997, Handunnetthi, Ramagopalan et al. 2010, Ramagopalan, Handel et al. 2011, Dobson, Giovannoni et al. 2013, Hintzen 2013). En effet, le 7-déhydrocholesterol produit par les kératinocytes est converti en pré-vitamine D₃ par les rayons UVB, avant de spontanément se convertir en vitamine D₃, qui sera ensuite elle-même convertie au foie en 25(OH)D₃ puis aux reins ou dans les organes cibles en 1,25(OH)₂D₃ (Holick 1995, Hart, Gorman et al. 2011). La forme biologiquement active, 1,25(OH)₂D₃, se lie au récepteur de vitamine D (Pilz, Tomaschitz et al. 2011). Suite à la formation d'hétérodimères avec le récepteur à rétinoïdes X, la translocation nucléaire survient (Smolders, Peelen et al. 2009, Hart, Gorman et al. 2011). À travers des régions de l'acide désoxyribonucléique (ADN) dites 'vitamin D-responsive elements', la transcription de nombreux gènes se trouve ainsi modulée (Ramagopalan, Maugeri et al. 2009, Pilz, Tomaschitz et al. 2011). Durant l'hiver, l'exposition aux rayons UV diminue considérablement dans les régions éloignées de l'équateur, entraînant un niveau sous-optimal ou même déficitaire chez 13-25% des adolescents et 29-47% des adolescentes américains (Looker, Dawson-Hughes et al. 2002).

Les niveaux sériques de vitamine D chez les enfants et les adolescents sont inversement corrélés au risque de développer la SEP (Munger, Levin et al. 2006, Banwell, Bar-Or et al. 2011). Les niveaux sériques de vitamine D sont également plus faibles chez les patients SEP que chez les contrôles, plus particulièrement durant les poussées (Smolders, Menheere et al. 2008, Correale, Ysrraelit et al. 2009, Simpson, Taylor et al. 2010, O'Gorman,

Lucas et al. 2012). Des études préliminaires ayant démontré une innocuité doublée d'un bénéfice potentiel de l'administration de suppléments de vitamine D en SEP (Kimball, Ursell et al. 2007), il s'agit actuellement d'une pratique clinique répandue bien que demandant confirmation de son efficacité (Freedman, Selchen et al. 2013). Plusieurs études utilisant un modèle animal de la SEP, l'encéphalite auto-immune expérimentale (EAE), confirment l'intérêt de la vitamine D pour contrôler les processus neuroinflammatoires, en particulier chez les femelles (Spach and Hayes 2005, Nashold, Spach et al. 2009, Subramanian, Miller et al. 2011). L'effet de la vitamine D en SEP reposerait principalement sur sa capacité à inhiber la maturation de cellules dendritiques (DC) (Hypponen 2010, Hewison 2011), la prolifération leucocytaire (Hewison 2011) et la polarisation vers les phénotypes TH1 et TH17 (Chang, Cha et al. 2010, Guillot, Semerano et al. 2010, Hart, Gorman et al. 2011, Hewison 2011). La vitamine D pourrait également présenter un rôle neuroprotecteur (Taniura, Ito et al. 2006, Dursun, Gezen-Ak et al. 2011, Nimitphong and Holick 2011).

1.3.2.4 Tabagisme

Contrairement à l'exposition *in utero* à des niveaux déficitaires de vitamine D, le tabagisme maternel n'aurait pas d'impact sur le risque de développer la SEP (Ramagopalan, Lee et al. 2013). Le tabagisme actif ou passif augmente toutefois significativement le risque de développer la SEP, avec un risque relatif (RR) estimé à 1.5 ou plus, en plus d'être associé à un risque augmenté de conversion de syndromes cliniques isolés en SEP, de conversion de SEP cyclique en progressive secondaire et d'augmentation du risque de poussées à travers le nombre accru d'infections respiratoires (Mikaeloff, Caridade et al. 2007, Handel, Williamson et al. 2011, Hedstrom, Baarnhielm et al. 2011, O'Gorman, Lucas et al. 2012, Asadollahi, Fakhri et al. 2013, Hedstrom, Hillert et al. 2013, Koch, Metz et al. 2013). Le tabagisme exercerait ses effets néfastes en causant un état pro-inflammatoire malgré une diminution de la capacité de défense contre les infections, une augmentation de la perméabilité de la BHE, ainsi qu'une augmentation de la démyélinisation et de l'atrophie du SNC (Zivadinov, Weinstock-Guttman et al. 2009, O'Gorman, Lucas et al. 2012). Par contre, l'arrêt tabagique, même après le début de la maladie, est associé à une diminution du risque de progression (Manouchehrinia, Tench et al. 2013).

1.3.2.5 Nutrition

L'obésité durant l'enfance et l'adolescence (jusqu'à 20 ans) augmente le risque de développer la SEP à l'âge adulte, et ce de façon plus prononcée chez les filles que chez les garçons (Hedstrom, Olsson et al. 2012, Langer-Gould, Brara et al. 2013, Munger, Bentzen et al. 2013, Hedstrom, Lima Bomfim et al. 2014). Plusieurs mécanismes ont été évoqués pour expliquer l'association entre l'obésité à l'adolescence et la SEP. Entre autres, l'obésité est associée avec des niveaux plus faibles de vitamine D. De plus, certaines hormones comme la leptine peuvent jouer un rôle dans l'inflammation tout comme dans le contrôle de la satiété et sont différemment régulées en obésité. Également, via l'induction de la 'serum glucocorticoid kinase 1' qui à son tour augmente l'expression du récepteur de l'IL-23, une diète riche en sodium résulterait en une augmentation de la fréquence de lymphocytes TH17 hautement pathogéniques et en une augmentation de la sévérité de la maladie en EAE (Kleinewietfeld, Manzel et al. 2013, Wu, Yosef et al. 2013). Finalement, la flore intestinale pourrait également influencer la polarisation lymphocytaire et la susceptibilité à développer l'EAE (Berer, Mues et al. 2011, Wekerle, Berer et al. 2013).

Les facteurs environnementaux et génétiques interagissent entre eux en SEP. Par exemple, les oestrogènes influencent les niveaux de vitamine D en inhibant la transcription de l'enzyme de dégradation de la vitamine D (Correale, Ysraelit et al. 2010). Une interaction significative entre l'indice de masse corporelle et le génotype HLA fait grimper le RR de SEP à 13.8 ou plus chez les adolescents obèses porteurs de l'allèle de susceptibilité HLA-DRB1*15 mais pas de l'allèle de protection HLA-A*02 (Hedstrom, Lima Bomfim et al. 2014). Les mécanismes épigénétiques, c'est-à-dire la régulation de l'expression ou de la transmission d'un gène donné par des facteurs en particulier environnementaux, sont activement étudiés en SEP. L'interaction des niveaux de vitamine D avec l'expression de l'allèle de risque HLA-DRB1*1501, à travers l'existence d'un 'vitamin D-responsive elements' au niveau de la séquence promotrice de ce dernier, en est un bon exemple en SEP (Ramagopalan, Maugeri et al. 2009, Huynh and Casaccia 2013, Koch, Metz et al. 2013).

1.4 Traitements

Les traitements spécifiques dits ‘disease-modifying therapies’ (DMT) actuellement approuvés en SEP au Canada sont uniquement utiles pour les formes cycliques de la maladie. Aucun traitement n’a pu démontrer un bénéfice dans les formes progressives (primaire ou secondaire) ne présentant pas de poussées surimposées.

Les traitements de première ligne, soit les interférons bêta et l’acétate de glatiramer, présentent une efficacité significative mais modeste pour réduire les poussées cliniques et radiologiques, et sont considérés comme sécuritaires bien que non dépourvus d’effets secondaires incommodes (Freedman, Selchen et al. 2013). Le mécanisme d’action des interférons bêta inclurait une diminution de la prolifération des lymphocytes et de leur production de cytokines pro-inflammatoires, une diminution de l’efficacité de la présentation d’antigènes, une inhibition de l’adhérence à la BHE et une stabilité accrue de la BHE (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, Frohman, Racke et al. 2006). Les effets secondaires les plus fréquents sont le syndrome pseudo-grippal et l’inflammation au site d’injection. Des effets secondaires graves sont rares mais possibles chez certains individus (Durelli, Ferrero et al. 1999, Walther and Hohlfeld 1999, Laroche, Grand'maison et al. 2014). L’acétate de glatiramer augmenterait le ratio TH2/TH1, nuirait à la présentation de peptides de myéline aux lymphocytes et induirait des lymphocytes Treg (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, Frohman, Racke et al. 2006). Outre les réactions au site d’injection et le ‘flushing’ transitoire, l’acétate de glatiramer est en général bien toléré.

Le teriflunomide est un traitement oral récemment approuvé en SEP, utilisé en général comme première ou deuxième ligne de traitement. Son efficacité clinique et radiologique en SEP est comparable à celle des interférons bêta (Vermersch, Czlonkowska et al. 2013). Ses effets secondaires sont en général légers à modérés. L’augmentation d’enzymes hépatiques, la nausée, la diarrhée et la perte de cheveux sont les plus fréquents, une neutropénie réversible étant rarement observée. Le teriflunomide est potentiellement tératogène chez l’humain. Son mécanisme d’action n’est pas complètement élucidé, il inhibe la synthèse *de novo* de pyrimidines chez les cellules en prolifération, agissant comme un agent cytostatique sur les leucocytes (Oh and O'Connor 2013, Vermersch, Czlonkowska et al. 2013).

Le diméthyl-fumarate est un agent oral qui exercerait des effets immunomodulateurs et peut-être neuroprotecteurs. Il est généralement utilisé comme agent de première ou de deuxième ligne. Il induirait l'apoptose des lymphocytes T, causant une réduction des CD4 et des CD8 circulants, ainsi qu'un changement en faveur de la production de cytokines Th2. Il inhibe la translocation nucléaire de NF-kappaB mais induit celle de Nrf2 et ainsi augmenterait la capacité anti-oxydante tout en diminuant l'état pro-inflammatoire. Les effets secondaires les plus fréquents sont l'atteinte gastro-intestinale (crampes et diarrhée), le flushing, la protéinurie, le prurit, l'érythème et les infections des voies respiratoires supérieures. Le risque de PML est toutefois présent, en particulier chez les patients chez qui le diméthyl-fumarate induit une importante lymphopénie (Oh and O'Connor 2013, Salmen and Gold 2014).

Le fingolimod est un traitement considéré de deuxième ligne (Freedman, Selchen et al. 2013). Il a été le premier traitement oral approuvé en SEP. Chez les patients traités avec le fingolimod moins de 3 ans après le début des symptômes de SEP, la réduction du taux de poussée annualisé pourrait atteindre 70% et s'accompagne d'une réduction significative du nombre de nouvelles lésions T2 à l'IRM (Agius, Meng et al. 2014). La réduction globale du taux de poussée annualisé sous traitement par fingolimod est statistiquement significative. Cependant, malgré une diminution significative du pourcentage de perte de volume cérébral, il n'y a pas de différence significative sur la progression estimée par l'EDSS. Par ailleurs, le traitement par fingolimod est associé à des effets secondaires potentiellement sévères, tels l'augmentation du risque de lymphopénie, d'infection par herpes zoster et d'autres types d'infections, d'hypertension artérielle, de bradyarythmie, de carcinome basocellulaire, d'œdème maculaire et de néoplasies (Calabresi, Radue et al. 2014). Le fingolimod se lie au récepteur à sphingosine-1-phosphate exprimé par les lymphocytes, ce qui cause son internalisation et entraîne une rétention accrue des leucocytes dans les ganglions lymphatiques (Oh and O'Connor 2013).

L'alemtuzumab a été récemment approuvé comme traitement de deuxième (voire de troisième) ligne. Il s'agit d'un anticorps monoclonal anti-CD52, qui cause une déplétion de lymphocytes T CD4 et CD8, de cellules 'natural killer' (NK) et de monocytes. Il est significativement supérieur au traitement par interféron bêta pour supprimer les poussées et l'activité radiologique en SEP. Toutefois, son influence sur les lymphocytes B peut mener au

développement de maladies auto-immunes, avec un quart des patients qui développent des anticorps anti-thyroïdiens et au moins un décès secondaire à un purpura thrombocytopénique immun, en plus d'un risque augmenté d'infection. Son mécanisme d'action est basé sur la déplétion leucocytaire, il s'agit donc d'un traitement immunosuppresseur (Hauser 2008, Investigators, Coles et al. 2008, Fernandez 2014).

Le natalizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine alpha-4, a été le premier traitement de deuxième ligne disponible au Canada. Son efficacité est considérée supérieure à celle des traitements de première ligne en ce qui concerne la réduction de l'activité clinique et radiologique (Polman, O'Connor et al. 2006). Toutefois, son utilisation est associée à un risque non négligeable de leucoencéphalopathie multifocale progressive (LMP), résultant d'une infection du SNC par le virus John Cunningham (JCV). Le risque de LMP est augmenté chez les patients ayant déjà été exposés à un traitement immunosuppresseur, ceux qui ont reçu 24 infusions de natalizumab et ceux qui présentent des anticorps anti-JCV (Ransohoff 2005, Sorensen, Bertolotto et al. 2012). L'arrêt du natalizumab peut également entraîner une activité rebond en SEP, pour laquelle la prise en charge optimale demeure à déterminer (Havla, Kleiter et al. 2013, Sorensen, Koch-Henriksen et al. 2014). Son principal mécanisme d'action est de bloquer l'adhérence des leucocytes à la BHE via l'interaction entre l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ exprimée par les cellules immunitaires avec la 'vascular cell adhesion molecule-1' (VCAM-1) exprimée par la BHE, restreignant ainsi la transmigration de leucocytes périphériques vers le SNC (Polman, O'Connor et al. 2006).

Les leucocytes non activés ne peuvent traverser la BHE et atteindre le SNC. Le contrôle de l'activité clinique et radiologique en SEP semble donc dépendre en grande partie du contrôle de la capacité des cellules immunitaires d'envahir le SNC, soit en diminuant le profil inflammatoire des leucocytes périphériques, en déplaçant les cellules immunitaires inflammatoires circulantes ou en restreignant les interactions des leucocytes périphériques avec la BHE. La composition et la fonction de la BHE seront revues dans la prochaine section.

Chapitre 2. La barrière hémato-encéphalique

Le SNC reçoit une proportion considérable du débit sanguin cardiaque à travers quatre larges artères cérébrales qui se ramifient en petites artères et artérioles et forment finalement un réseau complexe ramifié de capillaires puis de veinules, qui assurent aux cellules résidentes du SNC respectivement l'apport en nutriments et oxygène et l'élimination des déchets et du CO₂. Les échanges entre le compartiment du SNC, qui abrite des cellules au potentiel de régénération limité (oligodendrocytes et neurones) et dont la fonction nécessite un milieu extracellulaire stable (transmission d'influx nerveux), et le compartiment sanguin, qui contient une grande diversité de molécules et cellules qui peuvent varier en fonction de l'environnement, sont strictement régulés par la présence de la BHE (Abbott, Patabendige et al. 2010). Le SNC, tout comme l'œil et le testicule, est donc considéré comme un organe immunoprivilégié puisqu'en condition physiologique, la BHE limite la circulation de molécules et de cellules de la périphérie vers le SNC (Mrazek and Weinger 2006).

2.1 Composition de la BHE

La BHE se retrouve au niveau des capillaires et veinules, le principal lieu d'échanges entre le compartiment sanguin et celui du SNC (Engelhardt 2006, Bechmann, Galea et al. 2007). La première couche de la BHE, en contact direct avec le sang, est composée de cellules endothéliales spécialisées présentant un contenu mitochondrial élevé (Oldendorf, Cornford et al. 1977). Cet endothélium non fenêtré restreint la diffusion transcellulaire des éléments du sang par une faible activité pinocytaire. Au contraire, à travers la grande activité de plusieurs transporteurs impliqués dans l'efflux de médiateurs solubles et spécifiquement exprimés au niveau de la membrane luminale ou de la membrane abluminale, l'endothélium permet l'apport de nutriments aux cellules du SNC mais assure l'expulsion active des métabolites toxiques du SNC vers le sang (Fenstermacher, Gross et al. 1988, Sedlakova, Shivers et al. 1999, Abbott, Patabendige et al. 2010, Alvarez, Cayrol et al. 2011, Engelhardt and Liebner 2014). Récemment, la capacité du transporteur P-glycoprotéine à participer à la sécrétion de chimiokines influençant la perméabilité de la BHE à la migration des CD8 a été démontrée (Kooij, Kroon et al. 2014), tout comme l'implication du 'Duffy antigen receptor for

chemokines' dans le transport de chimiokines à travers les cellules endothéliales de la BHE de la surface abluminale vers le sang (Minten, Alt et al. 2014), suggérant une influence de l'activité des transporteurs non seulement sur l'expulsion transcellulaire de toxines mais aussi sur la migration leucocytaire.

Les cellules endothéliales de la BHE restreignent les échanges paracellulaires à travers la formation de jonctions intercellulaires serrées et adhérentes (Figure 4). Ces jonctions intercellulaires, concentrées au niveau de micro-domaines membranaires appelés radeaux lipidiques, sont formées par des protéines transmembranaires qui s'emboîtent en complexes macromoléculaires à l'image d'une fermeture éclair intercellulaire. Les jonctions serrées sont formées de protéines appartenant à la famille des claudines, des occludines et des molécules d'adhérence jonctionnelles (Brightman and Reese 1969, Kniesel and Wolburg 2000, Huber, Egleton et al. 2001, Mrass and Weninger 2006). Les protéines claudines 1, 3 et 5 seraient exprimées au niveau de la BHE, et par la formation d'homodimères avec les claudines exprimées par les cellules endothéliales adjacentes, elles formeraient la barrière paracellulaire primaire (Huber, Egleton et al. 2001). Leur fonction de barrière est fortement influencée par leur degré de phosphorylation, et est donc influencée par l'activité de kinases et par la concentration d'AMPc (Huber, Egleton et al. 2001, Goncalves, Ambrosio et al. 2013). La claudine-5 est essentielle à la fonction de barrière de la BHE, les souris déficientes en claudine-5 démontrant une perméabilité accrue de la BHE et ne survivant pas jusqu'à l'âge adulte (Nitta, Hata et al. 2003, Engelhardt and Liebner 2014). L'occludine est une protéine régulatrice des jonctions serrées qui diminue la perméabilité paracellulaire. Les molécules d'adhérence jonctionnelles sont quant à elles impliquées dans la régulation de la migration leucocytaire, de concert avec la 'platelet endothelial adhesion molecule 1' (PECAM1) (Huber, Egleton et al. 2001). Ces protéines sont ancrées aux filaments d'actine du cytosquelette par des molécules adaptrices comme les zona occludens (impliquées dans le placement des protéines de jonctions serrées), la cinguline et la protéine sérine kinase dépendante du calcium (Huber, Egleton et al. 2001, Abbott, Patabendige et al. 2010, Alvarez, Cayrol et al. 2011). Les jonctions adhérentes sont formées de protéines comme la cadhérine vasculaire-endothéliale, liées au cytosquelette par les caténines (alpha, bêta et p120), et seraient essentielles à la formation des jonctions serrées (Brightman and Reese 1969, Schulze and Firth 1993, Huber,

Egleton et al. 2001, Abbott, Patabendige et al. 2010, Alvarez, Cayrol et al. 2011). La liaison des protéines de jonctions au cytosquelette jouerait un rôle dans l'intégrité structurale et la fonction des jonctions serrées, en plus d'influencer la perméabilité paracellulaire via la contraction du cytosquelette qui peut augmenter l'espace entre deux cellules endothéliales (Huber, Egleton et al. 2001, Abbott, Patabendige et al. 2010, Huppert, Closhen et al. 2010, Alvarez, Katayama et al. 2013). Il a récemment été démontré que contrairement aux autres cellules endothéliales, les cellules endothéliales de la BHE ne s'allongent pas en réponse au stress de courbure et de forces de cisaillement, minimisant ainsi la surface de jonctions serrées et le transport paracellulaire (Ye, Sanchez et al. 2014).

L'endothélium de la BHE est bordé par une lame basale endothéliale dans laquelle s'enchâssent des péricytes, impliqués dans le développement et le maintien de la BHE (Armulik, Genove et al. 2010, Daneman, Zhou et al. 2010, Kamouchi, Ago et al. 2010, Armulik, Genove et al. 2011, Armulik, Mae et al. 2011). La lame basale endothéliale est formée de protéines de la matrice extracellulaire comme la fibronectine, le collagène type IV, le perlecan et les laminines 411 et 511 (Sixt, Engelhardt et al. 2001, Mrass and Weninger 2006, Engelhardt and Liebner 2014). Cette matrice extracellulaire contribue à entraver la circulation cellulaire et moléculaire de la périphérie vers le SNC. Les cellules endothéliales adhèreraient à la laminine de la lame basale endothéliale via l'intégrine bêta 1, cette interaction participant à la stabilisation de la claudine-5 (Osada, Gu et al. 2011, Engelhardt and Liebner 2014). Une deuxième lame basale est à franchir avant d'atteindre le tissu nerveux. La lame basale parenchymateuse ou astrogliale est produite par les astrocytes et est formée des protéines fibronectine et agrine et des laminines 111 et 211 (Sixt, Engelhardt et al. 2001, Mrass and Weninger 2006, Alvarez, Katayama et al. 2013, Engelhardt and Liebner 2014). Les pieds astrocytaires enrobent 90-99% des microvaisseaux cérébraux (Engelhardt and Liebner 2014). Ils sont attachés à la lame basale parenchymateuse via l'expression de dystroglycan qui interagit avec l'agrine de la lame basale parenchymateuse (Agrawal, Anderson et al. 2006, Alvarez, Katayama et al. 2013, Engelhardt and Liebner 2014). Ensemble ils forment la *glia limitans vascularis*, qui limite le passage des cellules de l'espace périvasculaire vers le parenchyme cérébral (Agrawal, Anderson et al. 2006, Owens, Bechmann et al. 2008). La lame basale endothéliale délimite en effet avec la lame basale parenchymateuse les deux bordures

de l'espace périvasculaire, virtuel au niveau des capillaires et présent au niveau des veinules, où survient la réactivation lymphocytaire en présence de cellules présentatrices d'antigènes (APCs) en SEP (Figure 3 et 4). Cette réactivation et la présence d'APCs serait nécessaire pour que les lymphocytes traversent la *glia limitans vascularis* (Owens, Bechmann et al. 2008, Abbott, Patabendige et al. 2010, Larochelle and Prat 2013).

2.2 Influence des péricytes et des astrocytes sur la BHE

Durant l'embryogénèse, les cellules du SNC dirigent la différenciation des cellules endothéliales en endothélium spécialisé de la BHE (Ikeda, Flamme et al. 1996). Les péricytes seraient cruciaux durant l'embryogénèse pour le développement de la BHE et participeraient au maintien des caractéristiques de la BHE chez l'adulte et à la polarisation des pieds astrocytaires (Armulik, Genove et al. 2010, Daneman, Zhou et al. 2010, Kamouchi, Ago et al. 2010, Alvarez, Katayama et al. 2013, Engelhardt and Liebner 2014). Une récente étude a en outre démontré que les péricytes sont des régulateurs majeurs du flot sanguin au niveau des capillaires cérébraux en réponse à l'activité neuronale, se relaxant en présence de prostaglandine E₂ et de NO, possiblement produits par les astrocytes ou les neurones en réponse au glutamate (Hall, Reynell et al. 2014).

Les astrocytes participent au développement et au maintien de la BHE via des facteurs contact-dépendants et des facteurs solubles comme le 'basic fibroblast growth factor', le 'transforming growth factor beta' (TGF- β), le 'glial-derived neurotrophic factor', l'enzyme de conversion de l'angiotensine, l'angiopoïétine-1, le 'src-suppressed C-kinase substrate', l'acide rétinoïque, les thrombospondines, l'apolipoprotéine E et les membres de la famille Hedgehog (Lee, Kim et al. 2003, Abbott, Ronnback et al. 2006, Wosik, Cayrol et al. 2007, Alvarez, Dodelet-Devillers et al. 2011, Alvarez, Katayama et al. 2013, Engelhardt and Liebner 2014). Ces facteurs contribuent à l'expression des protéines de jonctions serrées et à la maturation vasculaire (Prat, Biernacki et al. 2001, Engelhardt and Liebner 2014). Par exemple, les souris déficientes en angiotensinogène démontrent une perméabilité accrue de la BHE secondaire à l'altération de l'expression d'occludine (Wosik, Cayrol et al. 2007). Le 'Src suppressed C kinase substrate' augmente l'expression d'angiopoïétine-1. Ces deux facteurs augmentent

l'expression de molécules de jonctions serrées comme la claudine-1 et la zona occludens-1 (Lee, Kim et al. 2003, Alvarez, Katayama et al. 2013). Également, la molécule sonic hedgehog, à travers son récepteur Patched-1, augmente l'expression des protéines de jonction et promeut la fonction barrière de l'endothélium cérébral (Alvarez, Dodelet-Devillers et al. 2011). En plus d'influencer les caractéristiques de la BHE, les astrocytes participeraient aussi à la régulation du flot capillaire pour répondre à l'activité neuronale (Alvarez, Katayama et al. 2013). La sécrétion de laminines par les astrocytes serait nécessaire au maintien des péricytes dans un état quiescent et à la stabilisation de la BHE (Yao, Chen et al. 2014), alors que l'absence de péricytes mènerait à une perte de la membrane basale parenchymateuse et de l'expression d'aquaporine-4 au niveau des pieds astrocytaires (Armulik, Genove et al. 2010). À l'inverse, les cellules endothéliales de la BHE peuvent influencer le phénotype des astrocytes, entre autres par la sécrétion d'endothélines (Koyama and Michinaga 2012).

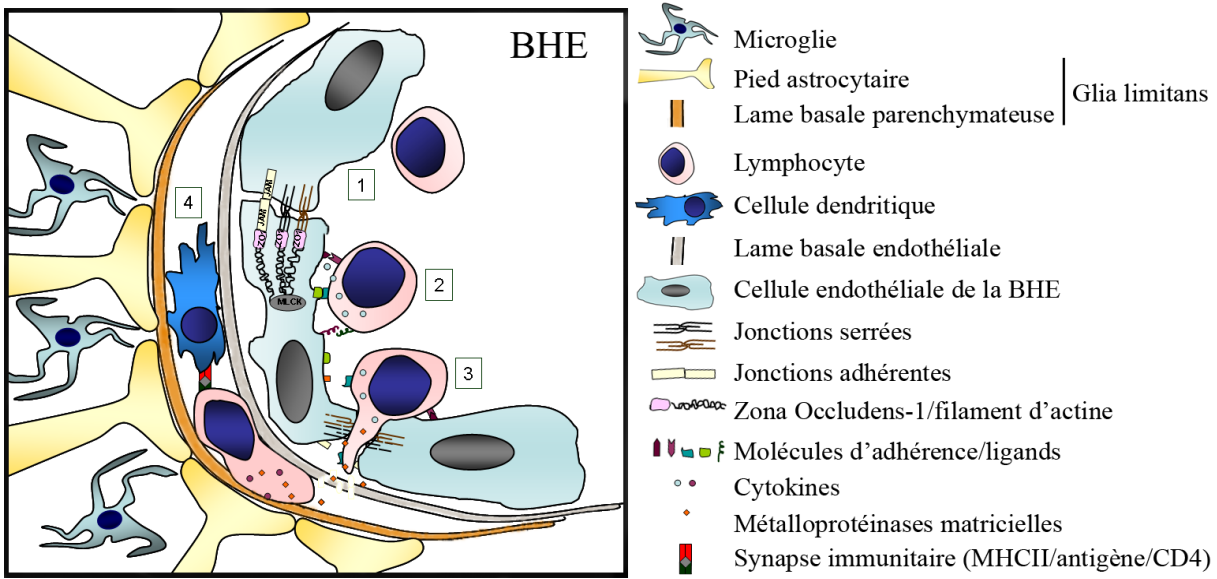


Figure 5 : Les étapes de la transmigration leucocytaire du sang périphérique vers le SNC.

1-En condition physiologique, la BHE et les lymphocytes expriment peu de molécules d'adhérence/ligands. L'accès des leucocytes au SNC est hautement limité.

2-En condition inflammatoire, une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence et de leurs ligands favorise les interactions BHE/leucocytes. Ces interactions mènent à l'adhérence des leucocytes à la BHE et à l'augmentation d'avidité des ligands leucocytaires, via les chimiokines.

3-Après adhérence ferme, les leucocytes peuvent migrer à travers la BHE par la voie transcellulaire ou la voie paracellulaire. La sécrétion de cytokines et de métalloprotéinases matricielles par les leucocytes activés peut affecter l'intégrité des jonctions serrées et de la matrice extracellulaire, favorisant la migration intercellulaire et trans-matricielle.

4-Une fois l'espace périvasculaire atteint, les lymphocytes devront être réactivés par des cellules présentatrices d'antigène avant de pouvoir franchir la *glia limitans vascularis*.

Adapté avec permission (Larochelle and Prat 2013).

2.3 La transmigration leucocytaire vers le SNC à travers la BHE

La BHE contrôle le trafic leucocytaire du sang vers le SNC, de sorte qu'en condition physiologique seul un nombre restreint de cellules immunitaires peut traverser la BHE pour effectuer l'immunosurveillance du SNC. Plusieurs étapes durant lesquelles les leucocytes doivent interagir avec la BHE sont nécessaires à la diapédèse. Les étapes classiques de la migration sont le roulement/adhérence/capture, l'activation, l'ancrage, le rampement et finalement la transmigration (Figure 4). Chacune de ces étapes implique l'interaction de molécules d'adhérence exprimée par l'endothélium de la BHE avec leurs ligands exprimés par les leucocytes (Ransohoff, Kivisakk et al. 2003, Engelhardt 2006, Larochelle, Alvarez et al. 2011, Larochelle and Prat 2013).

La première étape cruciale est la capture des leucocytes, qui peut être précédée ou non par le roulement des leucocytes sur l'endothélium à travers l'interaction des sélectines E et P endothéliales avec le récepteur 'P-selectin glycoprotein ligand-1' (PSGL-1) (Ransohoff, Kivisakk et al. 2003, Sathiyandan, Coisne et al. 2014). La capture et l'adhérence ferme du leucocyte aux micro-vaisseaux du SNC dépend principalement de l'interaction entre l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ (very late antigen-4 ou VLA-4) leucocytaire et la VCAM-1 endothéliale (Engelhardt 2006). L'interaction entre l'intégrine 'leukocyte function-associated antigen-1' (LFA-1 ou $\alpha_L\beta_2$) leucocytaire et l'intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) contribuerait à l'adhérence ferme, le rampement et la polarisation, mais surtout l'extravasation des lymphocytes T à travers la BHE vers l'espace périvasculaire (Engelhardt 2006, Engelhardt and Coisne 2011). L'adhérence ferme, arrêt ou ancrage des leucocytes à la surface de la BHE dépend de l'activation des intégrines leucocytaires. En effet, l'interaction de chimiokines immobilisées sur la surface de l'endothélium avec leur récepteur couplé à la protéine G à la surface des leucocytes induit une signalisation intracellulaire menant à une activation des intégrines leucocytaires. Les intégrines subissent un changement de conformation lors de l'activation, qui résulte en une avidité accrue pour leur ligand endothélial (Grabovsky, Feigelson et al. 2000, Engelhardt 2006, Shulman, Shinder et al. 2009). Une fois bien ancrés à la surface des cellules endothéliales, les leucocytes sont en bonne position pour effectuer une migration trans ou para-cellulaire. L'intérêt clinique des interactions entre les molécules

d'adhérence et leurs ligands en SEP est démontré par l'efficacité clinique du natalizumab (Polman, O'Connor et al. 2006). Toutefois, les intégrines $\alpha_4\beta_1$ et LFA-1 étant exprimées par une large proportion des leucocytes périphériques, le natalizumab et l'efalizumab (anticorps monoclonal anti-CD11a, la sous-unité alpha de LFA-1) peuvent entraîner une immunosuppression du SNC et mener, tel que précédemment mentionné, à une infection potentiellement fatale par le JCV (Ransohoff 2005, Carson, Focosi et al. 2009, Sorensen, Bertolotto et al. 2012). D'autres molécules d'adhérence participent au recrutement de sous-populations leucocytaires spécifiques vers le SNC, entre autres 'l'activated leukocyte cell adhesion molecule' (ALCAM) pour le recrutement des monocytes et des CD4 (Cayrol, Wosik et al. 2008) et Ninjurin-1 pour le recrutement des APCs (Ifergan, Kebir et al. 2011).

Après avoir franchi l'endothélium de la BHE, les leucocytes en route vers le SNC doivent traverser la lame basale endothéliale. L'interaction entre les leucocytes en migration et les composantes de la matrice extracellulaire influence la capacité à s'introduire dans l'espace périvasculaire. En effet, l'infiltration périvasculaire est significativement réduite en l'absence de laminine 411 (Sixt, Engelhardt et al. 2001, Wu, Ivars et al. 2009). La sécrétion de protéases ayant la capacité de dégrader les protéines de la lame basale comme les métalloprotéinases matricielles protéiques (MMP) serait également corrélée avec la capacité des leucocytes de traverser la BHE pour envahir le SNC (Graesser, Mahooti et al. 2000, Agrawal, Anderson et al. 2006, Zozulya, Reinke et al. 2007, Agrawal, Lau et al. 2008, Agrawal, Silva et al. 2011, Agrawal and Yong 2011). Lorsque le leucocyte atteint l'espace périvasculaire, il doit d'abord être réactivé par des APCs périvasculaires avant de pouvoir dégrader la lame basale parenchymateuse à l'aide de protéases et envahir le parenchyme du SNC. Ainsi, l'accès au parenchyme du SNC à partir de l'espace périvasculaire est hautement restreint en condition physiologique (Agrawal, Anderson et al. 2006, Owens, Bechmann et al. 2008, Goverman 2009).

2.4 Plexus choroïdiens et vaisseaux méningés

Les leucocytes périphériques peuvent pénétrer dans le compartiment du SNC par d'autres points d'entrée ne présentant pas les mêmes propriétés que la BHE, en particulier au niveau des vaisseaux leptoméningés et des plexus choroïdiens. Au niveau des vaisseaux méningés, la couche interne de l'épithélium arachnoïdien présenterait des jonctions serrées (Abbott, Patabendige et al. 2010). Les capillaires des plexus choroïdiens sont fenestrés et la restriction des échanges entre le sang et le LCR se fait plutôt au niveau des cellules de l'épithélium choroïdien, qui expriment des jonctions serrées, entre autres claudine 1, 2 et 3 chez l'humain (Ransohoff, Kivisakk et al. 2003, Abbott, Patabendige et al. 2010, Goncalves, Ambrosio et al. 2013). Par rapport à la surface d'échange créée par le réseau des capillaires et veinules, la surface d'échange disponible au niveau des plexus choroïdiens et des vaisseaux méningés est extrêmement restreinte (Abbott, Patabendige et al. 2010). De plus, les sélectines E et P, exprimées par les vaisseaux leptoméningés et ceux des plexus choroïdiens mais pas par les capillaires et veinules post-capillaires du parenchyme, et leur ligand PSGL-1, exprimé par les leucocytes, sont nécessaires pour le 'rolling' des lymphocytes T sur l'endothélium du SNC mais leur absence n'abroge pas la capture des lymphocytes T par l'endothélium et n'influence pas l'invasion du parenchyme du SNC ou le cours de l'EAE (Kivisakk, Mahad et al. 2003, Ransohoff, Kivisakk et al. 2003, Sathiyadan, Coisne et al. 2014). Ces données suggèrent que l'étape cruciale du processus neuroinflammatoire en SEP se produit plutôt au niveau des capillaires et veinules post-capillaires du parenchyme du SNC, au niveau de la BHE (Larochelle, Alvarez et al. 2011), bien que l'interaction entre CCR6 exprimé par les lymphocytes CD4 TH17 et CCL20 exprimé au niveau du plexus choroïdien puisse aussi contribuer au développement de l'EAE (Reboldi, Coisne et al. 2009, Huber, Heink et al. 2013).

Chapitre 3. Les populations lymphocytaires pro-inflammatoires en SEP

Bien que la nature auto-immune de la SEP ne soit toujours pas confirmée, plusieurs facteurs appuient la contribution majeure du système immunitaire à son développement, entre autres la nature des facteurs de prédisposition génétique, la réponse aux traitements immunosuppresseurs et la présence d'infiltrats leucocytaires au niveau des lésions du SNC (voir section 1). Le système immunitaire peut déployer une réponse inflammatoire contre un pathogène mais peut également 'tolérer' un antigène et générer une réponse anti-inflammatoire. Le thymus est responsable de la tolérance centrale, éliminant les lymphocytes T qui présentent une grande avidité pour des antigènes du soi. Le fait que le MOG et l'isoforme longue de la PLP ne soient pas exprimées dans le thymus ni dans le système nerveux périphérique est d'ailleurs à souligner (Klein and Kyewski 2000, Bruno, Sabater et al. 2002). Certaines populations leucocytaires sont donc considérées comme délétères ou pro-inflammatoires en SEP, alors que d'autres sont considérées comme bénéfiques ou anti-inflammatoires. La présente section s'attardera principalement à la description des différentes populations lymphocytaires CD4 et CD8 ayant un rôle potentiel en neuroinflammation. Bien que les autres populations leucocytaires (lymphocytes B, cellules T gammadelta, cellules NK, monocytes, macrophages, cellules dendritiques, granulocytes) jouent un rôle non négligeable en SEP, puisqu'elles ne font pas l'objet de cette thèse, elles ne seront pas revues en détail.

3.1 Modèles animaux

Une grande partie des connaissances actuelles concernant les interactions entre les cellules immunitaires périphériques et la BHE provient d'études utilisant l'EAE, le modèle animal de la SEP le plus répandu (Ransohoff, Kivisakk et al. 2003). Les souris transgéniques étant relativement faciles à générer, la majorité des études en EAE l'utilisent. Il existe actuellement trois formes principales d'EAE : active, passive et spontanée (Rangachari and Kuchroo 2013). L'EAE active s'effectue en immunisant une souris susceptible avec un peptide de myéline choisi selon la souche de la souris (par exemple le MOG₃₅₋₅₅ chez la souris C57Bl/6). Afin d'induire une réponse inflammatoire, le peptide de myéline est injecté dans une émulsion de 'complete Freund's adjuvant' (CFA) contenant une quantité variable de

Mycobacterium tuberculosis inactivé. De plus, deux injections de toxine pertussique sont en général effectuées durant les premiers jours suivant l'immunisation, afin de déstabiliser la BHE et d'augmenter l'inflammation au niveau du SNC. Selon la souche de souris et le peptide de myéline utilisés, les animaux développeront des symptômes de paralysie ascendante monophasique ou polyphasique avec poussées-rémissions (Stromnes and Goverman 2006, Miller and Karpus 2007). L'EAE passive s'effectue en transférant des lymphocytes réactivés pro-inflammatoires à des souris naïves dites 'récipients'. En fonction des conditions de réactivation et du type de cellules transférées, les animaux développeront des symptômes classiques d'EAE (paralysie ascendante) ou des symptômes atypiques d'EAE (désorientation, ataxie, perte d'équilibre, troubles proprioceptifs) (Huseby, Liggitt et al. 2001, Stromnes and Goverman 2006, Miller and Karpus 2007, Stromnes, Cerretti et al. 2008). L'EAE spontanée survient uniquement chez des modèles de souris transgéniques chez qui un 'T cell receptor' (TCR) mutant reconnaissant un peptide de myéline est exprimé par la vaste majorité des lymphocytes T dans un certain contexte de MHC. Chez ces animaux, des symptômes d'EAE typique ou atypique se développent spontanément, sans avoir recours à l'immunisation, l'injection de toxine pertussique ou au transfert de cellules activées (Bettelli, Pagany et al. 2003, Pollinger, Krishnamoorthy et al. 2009). Les déficits neurologiques observés chez ces différents modèles d'EAE sont en général largement attribuables à l'infiltration du parenchyme du SNC par des cellules immunitaires pro-inflammatoires, associée à divers degrés de dommage neuronal et de perte de myéline. Bien qu'aucun de ces modèles ne reflète avec exactitude la clinique et la pathologie de la SEP, leur utilisation permet l'étude de différents aspects du processus de formation des lésions inflammatoires du SNC (Simmons, Pierson et al. 2013).

3.2 Activation des lymphocytes

Le système immunitaire peut être divisé en composante innée, c'est-à-dire répondant de façon non spécifique à certains stimuli interprétés comme une menace pour l'organisme, versus adaptatif, qui implique une réponse coordonnée spécifique à l'antigène rencontré. Les lymphocytes CD4 et CD8 participent à la réponse adaptative, reconnaissant donc certains

antigènes spécifiques et étant capable de se différencier en cellules mémoire. La réponse des lymphocytes CD4 et CD8 dépend toutefois de la présentation d'antigènes associés à un MHC classe II dans le cas des CD4 et classe I dans le cas des CD8, respectivement associés à la présentation d'antigènes provenant de l'environnement extra ou intra-cellulaire. L'activation des CD4 est dépendant de cellules exprimant le MHC classe II, les APCs, et qui en SEP sont les cellules dendritiques, les macrophages, les monocytes, les lymphocytes B ou les microglies activées. L'activation des CD8 quant à elle nécessite la présentation d'un antigène associé à un MHC de classe I, qui est exprimé par la majorité des cellules hors du SNC de façon constitutive, incluant les cellules endothéliales de la BHE (Hoftberger, Aboul-Enein et al. 2004). La reconnaissance du complexe MHC/peptide sur l'APC par le lymphocyte T ainsi que l'interaction simultanée de molécules de co-stimulation présentes sur la cellule présentatrice et de leur récepteur à la surface lymphocytaire sont nécessaires pour activer le lymphocyte. Une fois activé, il effectuera une expansion clonale. Le lymphocyte non activé est dit naïf. Suite à l'activation ou la réactivation, le lymphocyte peut se différencier en cellule mémoire, centrale ou effectrice. Le phénotype du lymphocyte réactivé sera grandement influencé par son affinité pour le complexe MHC/peptide, la disponibilité ou quantité de complexe MHC/peptide à la surface de la cellule présentatrice, le type de molécules de co-stimulation présentes à la surface de la cellule présentatrice et les cytokines présentes dans l'environnement immédiat (Goverman 2009, Ifergan 2011).

3.3 Les sous-populations lymphocytaires CD4

Le modèle animal de l'EAE reposant principalement sur l'activation des CD4 par un peptide de myéline présenté sur un MHC classe II par une APC, l'implication des CD4 en neuroinflammation a été étudiée extensivement. Outre les CD4 naïfs, on distingue généralement 4 grandes sous-populations lymphocytaires CD4, soit les TH1, les TH17, les TH2 et les Treg. Les facteurs impliqués dans leur différenciation, leur phénotype et leur rôle en SEP seront brièvement présentés. D'autres sous-populations (gamma delta, TH9) peuvent également être distinguées, mais leur implication en SEP et en EAE est plus nébuleuse.

3.3.1 TH1

Les TH1 sont reconnus par leur production de la cytokine IFN- γ sous la gouverne du facteur de transcription T-bet, en présence de la cytokine IL-12. Ils sécrètent également l'IL-2 et le TNF. Les TH1 expriment préférentiellement les récepteurs CXCR3 et CCR5, et leurs niveaux d'expression d'intégrine $\alpha 4\beta 1$ seraient plus élevés que chez les TH17 (Rothhammer, Heink et al. 2011) Les TH1 seraient particulièrement impliquées dans la lutte contre les pathogènes intracellulaires (Reiner 2007, Goverman 2009, Korn, Bettelli et al. 2009). Ils recrutent préférentiellement des macrophages au site d'inflammation (Kroenke, Carlson et al. 2008).

Les TH1 ont longtemps été considérés comme le principal sous-groupe pathogénique en SEP et EAE. En effet, de nombreux lymphocytes exprimant l'IFN- γ sont retrouvés dans les lésions du SNC en SEP et en EAE et le transfert adoptif de cellules TH1 induit l'EAE (Pierson, Simmons et al. 2012). Les souris déficientes en T-bet ont été initialement réputées résistantes à l'EAE, mais deux études récentes démontrent un simple délai de l'EAE en l'absence de T-bet s'il y a présence d'IL-23 durant la réactivation des lymphocytes (Grifka-Walk, Lalor et al. 2013, O'Connor, Cambrook et al. 2013, Spath and Becher 2013). Chez l'humain, l'administration d'IFN- γ a provoqué l'exacerbation de la SEP et l'augmentation de la prolifération leucocytaire, de l'activité des cellules NK et de l'expression de MHC classe II par les monocytes (Panitch, Hirsch et al. 1987, Panitch, Hirsch et al. 1987). Toutefois, l'IFN- γ serait protecteur au niveau cérébral (favorisant l'infiltration en spinal) en EAE, agissant entre autres comme un inhibiteur du recrutement des neutrophiles, médié par la sécrétion astrocytaire de CXCL2, au niveau cérébral, mais au contraire favorisant le recrutement au niveau spinal à travers la promotion de la sécrétion d'IL-1 β et indirectement de CXCL2 par les astrocytes de la moelle épinière (Simmons, Liggitt et al. 2014). L'IFN- γ pourrait en outre améliorer l'EAE en supprimant l'expansion des CD4 activés (Ferber, Brocke et al. 1996, Krakowski and Owens 1996, Willenborg, Fordham et al. 1996, Chu, Wittmer et al. 2000, Pierson, Simmons et al. 2012). L'IL-12 et le TNF ne sont pas essentiels au développement de l'EAE (Goverman 2009) et chez l'humain les anticorps anti-TNF peuvent causer des épisodes de démyélinisation (Kaltsonoudis, Voulgari et al. 2014). Une étude récente rapporte que les TH1 exprimeraient de plus hauts niveaux d'intégrine $\alpha 4$ en comparaison aux TH17, et la

déficiences en intégrine $\alpha 4$ abrogeraient le transfert de l'EAE par les TH1 mais pas par les TH17. Les patients SEP cyclique ayant généralement une amélioration de la maladie sous natalizumab, il est proposé qu'ils présenteraient donc plutôt un profil TH1 (Rothhammer, Heink et al. 2011). Cependant, il est à noter que dans le modèle animal utilisé, les TH1 infiltrent principalement la moelle épinière alors que les TH17 infiltrent plus volontiers le cerveau, la déficience en intégrine $\alpha 4$ améliore donc uniquement l'infiltration spinale. En clinique, les patients qui bénéficient du natalizumab sont les SEP cycliques, qui présentent une charge lésionnelle en général plus importante au niveau cérébral que médullaire.

3.3.2 TH17

Les TH17 sont des lymphocytes CD4 caractérisés par la production de la cytokine IL-17 (A et F) sous la gouverne des facteurs de transcription ROR- γ t et ROR α , en présence de TGF- β et IL-6, IL-1, IL-21 et d'IL-23, cette dernière cytokine étant la plus critique et essentielle à la croissance et la stabilisation du phénotype (Cua, Sherlock et al. 2003, Langrish, Chen et al. 2005, Reiner 2007, Korn, Bettelli et al. 2009, McGeachy, Chen et al. 2009). Les TH17 expriment préférentiellement le récepteur à l'IL-23, la molécule de co-stimulation CD161 et le récepteur à chimiokine CCR6 (Cosmi, De Palma et al. 2008, Annunziato, Cosmi et al. 2012). L'interaction entre CCR6 et son ligand CCL20 induit l'activation de LFA-1 et augmente l'adhérence à ICAM-1 (Alcaide, Maganto-Garcia et al. 2012) et pourrait être impliqué dans la migration des TH17 à travers le plexus choroïdien (Reboldi, Coisne et al. 2009). Les TH17 seraient nécessaires à la clairance de certains pathogènes extracellulaires, notamment fongiques et bactériens (Korn, Bettelli et al. 2009). Ils recrutent principalement des neutrophiles au site d'inflammation (Reiner 2007, Kroenke, Carlson et al. 2008), particulièrement au niveau du cerveau où les neutrophiles jouent un rôle critique dans la formation de lésions intra-parenchymateuses (Simmons, Liggitt et al. 2014).

Contrairement à l'IL-12, l'IL-23 et son récepteur sont nécessaires à l'induction de l'EAE (McGeachy, Chen et al. 2009). Les souris déficientes en IL-6 sont également résistantes à l'EAE (Eugster, Frei et al. 1998, Okuda, Sakoda et al. 1998). L'absence de ROR- γ t seulement n'abroge pas l'EAE, bien que la délétion de ROR γ t et de ROR α la supprime (Spath and Becher 2013). Toutefois, à l'image de l'IFN- γ pour les TH1, la production d'IL-17

ne serait pas essentielle en EAE classique (Haak, Croxford et al. 2009, Kroenke, Chensue et al. 2010) bien qu'elle puisse être nuisible (Komiya, Nakae et al. 2006, Mardiguian, Serres et al. 2013). Au contraire, l'IL-17 est requis pour l'induction de l'EAE atypique par transfert et pour la présence d'infiltrats au niveau du tronc cérébral (Kroenke, Chensue et al. 2010). Par ailleurs, l'utilisation d'un antagoniste du IL-1R ne supprime pas l'EAE (Kroenke, Chensue et al. 2010). L'IL-21 (Sonderegger, Kisielow et al. 2008) et l'IL-22 (Kreymborg, Etzensperger et al. 2007) ne sont pas non plus essentiels en EAE.

L'IL-23 est significativement plus élevée en périphérie chez les patients SEP (Krakauer, Sorensen et al. 2008, Alexander, Harris et al. 2010). Les niveaux d'IL-17 sont également augmentés chez les patients SEP par rapport aux sujets sains, particulièrement durant les poussées (Matusevicius, Kivisakk et al. 1999, Durelli, Conti et al. 2009, Alexander, Harris et al. 2010), alors qu'un polymorphisme de l'IL-21 pourrait influencer la susceptibilité à développer la SEP. On retrouve des TH17 au sein des lésions du SNC en SEP et en EAE (Kebir, Kreymborg et al. 2007, Tzartos, Friese et al. 2008), un argument majeur en faveur de leur implication en SEP.

3.3.3 TH2

Les TH2 sont reconnus comme produisant l'IL-4, l'IL-5, l'IL-9, l'IL-13 et l'IL-25 sous l'influence de la cytokine IL-4 et du facteur de transcription GATA-3. Ils sont particulièrement impliqués dans la réponse immunitaire aux parasites extracellulaires et l'aide à la production d'anticorps par les lymphocytes B (Reiner 2007, Korn, Bettelli et al. 2009, Ifergan 2011). Bien qu'incriminés dans d'autres maladies inflammatoires comme l'asthme (Barnes 2001), ils sont en général considérés protecteurs en SEP, en accord avec les données supportant une amélioration de la maladie en présence d'infection parasitaire (voir chapitre 1).

3.3.4 Treg

Les Treg seraient des lymphocytes T exprimant CD25 et le facteur de transcription FoxP3 et produisant de l'IL-10 et du TGF- β en réponse au TGF- β . Le degré de méthylation du gène *FoxP3* influence le degré de commission du lymphocyte vers le phénotype Treg. Ils expriment le 'cytotoxic T-lymphocyte antigen 4' (CTLA-4) et le 'glucocorticoid-induced TNF receptor-related protein (GITR), CCR4 ainsi que CD62L, bien qu'aucun marqueur de surface

spécifique aux Treg ne soit encore rapporté. Les Treg tempéieraient la réponse inflammatoire afin d'empêcher la réaction contre un pathogène de perdurer indéfiniment ou d'atteindre un état inflammatoire menaçant l'intégrité ou la survie de l'organisme (Lowther and Hafler 2012).

Les Treg suppriment la prolifération et la production de cytokines par les autres leucocytes. L'absence de FoxP3 chez l'humain et chez la souris résulte en une auto-immunité systémique fatale en bas âge (Lowther and Hafler 2012). Le transfert de Treg améliore l'EAE (Kohm, Carpentier et al. 2002). La capacité suppressive des CD4 Treg des patients serait moindre que celle des contrôles sains et les Treg augmentent durant les périodes de rémission, suggérant un effet protecteur en SEP (Lowther and Hafler 2012).

3.4 Les sous-populations lymphocytaires CD8

Les lymphocytes CD8 sont classiquement considérés comme des cellules T cytotoxiques (Tc). Les CD8 peuvent en effet synthétiser et relâcher des granules cytotoxiques (granzymes A et B, perforine), qui peuvent ouvrir un pore, s'infiltrer dans la cellule cible et y causer la lyse de protéines, induisant l'apoptose de la cellule. Les CD8 peuvent également présenter des fonctions effectrices par la sécrétion de cytokines comme le TNF, l'INF- γ et l'IL-2 (Goverman 2009). L'IL-12 peut induire la prolifération et la production d'IFN- γ (Annibali, Ristori et al. 2011, Tajima, Wakita et al. 2011), ce qui suggère un phénotype Tc1 (Sad, Marcotte et al. 1995). Les CD8 qui expriment CD161 et CCR6 peuvent sécréter l'IL-17 et sont alors désignés par l'appellation Tc17 (Maggi, Santarlaschi et al. 2010, Denic, Wootla et al. 2013). Comme pour les CD4, L'IL-23 induirait la production d'IL-17 par les CD8 (Ciric, El-behi et al. 2009, Saxena, Martin-Blondel et al. 2011). Une sous-population des CD8 est considérée régulatrice ou suppressive. La fonction régulatrice serait associée à l'expression du facteur de transcription FoxP3 et du marqueur de surface CD122, à l'absence d'expression de CD28 et à la sécrétion d'IL-4 et d'IL-10 (Gilliet and Liu 2002, Najafian, Chitnis et al. 2003, Biegler, Yan et al. 2006, Correale and Villa 2010, Saxena, Martin-Blondel et al. 2011, Gravano and Hoyer 2013). Ces CD8 régulateurs pourraient lyser les CD4 pro-inflammatoires en reconnaissant la molécule MHC non classique Qa-1 sur les CD4 (Lu, Kim et al. 2008), en

supprimant les CD8 effecteurs (Mangalam, Luckey et al. 2012) ou en influençant les cellules dendritiques (Najafian, Chitnis et al. 2003). Les sous-populations de CD8, leurs marqueurs de surface, les cytokines et facteurs de transcription impliqués dans leur différenciation et leur fonction et leurs rôles en état physiologique et pathologique ont toutefois été beaucoup moins étudiés que les sous-populations de CD4, et sont par conséquent nettement moins bien définis (Denic, Wootla et al. 2013).

Le modèle animal de la SEP, l'EAE, étant basé sur la présentation d'un peptide exogène par le MHC classe II, la contribution des CD8 en SEP a été beaucoup moins étudiée que la contribution des CD4. Le MHC classe I est normalement associé à la présentation d'antigènes synthétisés par la cellule elle-même. Toutefois, une présentation croisée de peptides exogènes entrés dans la cellule par pinocytose ou phagocytose peut survenir (Perchellet, Brabb et al. 2008), en particulier en contexte inflammatoire (Calzascia, Masson et al. 2005). La majorité des cellules expriment le MHC classe I constitutivement, incluant les cellules endothéliales, les APCs et la microglie (Hoftberger, Aboul-Enein et al. 2004). Il a été rapporté que les cellules endothéliales de la BHE peuvent présenter un peptide intracérébral aux CD8 circulants à travers leur MHC classe I (Galea, Bernardes-Silva et al. 2007). Les microglies peuvent également présenter des peptides exogènes par présentation croisée, plus particulièrement lorsqu'exposées au GM-CSF (Beauvillain, Donnou et al. 2008). En condition inflammatoire, toutes les cellules du SNC peuvent exprimer le MHC classe I (Hoftberger, Aboul-Enein et al. 2004) et seraient donc susceptibles de présenter des peptides aux CD8.

Les allèles MHC classe I HLA-A*0301 et HLA-A*0201 influencent le risque de développer la SEP (International Multiple Sclerosis Genetics, Wellcome Trust Case Control et al. 2011). On retrouve des lymphocytes CD8 en grand nombre dans les lésions de SEP (Hauser, Bhan et al. 1986, Monteiro, Hingorani et al. 1995, Babbe, Roers et al. 2000, Bitsch, Schuchardt et al. 2000, Skulina, Schmidt et al. 2004, Frischer, Bramow et al. 2009, Lucchinetti, Popescu et al. 2011). En particulier, on retrouve plusieurs CD8 produisant de l'IL-17 au sein des lésions de SEP et la fréquence des Tc17 est augmentée dans le LCR des patients SEP (Tzartos, Friese et al. 2008, Huber, Heink et al. 2013). En EAE, bien que le rôle des CD8 soit encore controversé (Huber, Heink et al. 2013, Leuenberger, Paterka et al. 2013), en l'absence CD4 transgéniques réactivés *in vitro*, les CD8 non régulateurs et en particulier les

Tc17 semblent contribuer activement au processus neuroinflammatoire et au dommage infligé aux cellules résidentes du SNC (Huseby, Liggitt et al. 2001, Sun, Whitaker et al. 2001, Anderson, Chandwaskar et al. 2012, Denic, Wootla et al. 2013, Gravano and Hoyer 2013, Huber, Heink et al. 2013). Un modèle de souris transgéniques porteur de l'HLA-A*0301 humain et d'un TCR spécifique à un peptide PLP présenté par ce MHC classe I se caractérise par le développement d'EAE spontanée chez quelques animaux, et en EAE active les CD8 PLP-spécifiques initient l'inflammation et le dommage menant à l'essaimage antigénique ('epitope spreading') et à l'implication des CD4 anti-MOG (Friese, Jakobsen et al. 2008, Saxena, Martin-Blondel et al. 2011). Plus récemment, un modèle d'EAE spontanée forme poussée-rémission, avec symptômes atypiques et typiques secondaires à une infiltration du cervelet et du tronc plus prononcée que spinale, a été décrit chez des souris transgéniques porteuses d'un TCR spécifique pour un peptide de 'glial fibrillary acidic protein' (GFAP) présenté par un MHC classe I. Dans ce modèle, l'absence de lymphocytes B est associée à une maladie plus sévère et plus souvent progressive (Sasaki, Bean et al. 2014).

3.5 Plasticité

La dichotomie TH1-TH17 est utile en recherche mais probablement artificielle. En effet, plusieurs études démontrent clairement la plasticité des lymphocytes T, qui peuvent changer leur phénotype en fonction de leur environnement. Par exemple, l'IL-23 peut induire la production à la fois d'IFN- γ et d'IL-17 et les lymphocytes T générés en présence d'IL-23 peuvent induire l'EAE chez des hôtes déficients en IL-17R à travers la production d'IFN- γ (Kebir, Ifergan et al. 2009, Ahern, Schiering et al. 2010, Kroenke and Segal 2011). La co-expression de T-bet et ROR- γ t est possible (Kebir, Ifergan et al. 2009) et T-bet pourrait se lier au promoteur de l'IL-23R puis en augmenter la transcription (Gocke, Cravens et al. 2007). De plus, les lymphocytes TH17 peuvent se convertir en producteurs d'IFN- γ suite à leur entrée dans le SNC ou en culture si réactivés par présentation de leur antigène, et ce indépendamment de la présence d'IL-12 ou d'IL-23 (Domingues, Mues et al. 2010, Hirota, Duarte et al. 2011). Le transfert de TH1 ou de TH17 peuvent chacun induire l'EAE. Le co-transfert de ces deux sous-types pro-inflammatoires induirait toutefois une EAE sévère plus rapidement, suggérant

une synergie TH1-TH17 (Domingues, Mues et al. 2010). Le ratio TH1:TH17 influencerait la localisation des lésions en EAE, les TH1 induisant plus volontairement des symptômes classiques avec une atteinte spinale alors qu'en présence d'un nombre supérieur de TH17, les animaux développent plutôt une EAE atypique avec des lésions à la fois cérébrales et spinales. Cette différence serait en partie explicable par l'expression plus importante du récepteur à l'IFN- γ dans le cerveau à comparer à la moelle chez la souris (Kroenke, Carlson et al. 2008, Stromnes, Cerretti et al. 2008, Domingues, Mues et al. 2010, Pierson, Simmons et al. 2012).

La plasticité des Treg a également été démontrée. En présence d'IL-12, les Treg peuvent se mettre à sécréter l'INF- γ et leur capacité suppressive diminue (Dominguez-Villar, Baecher-Allan et al. 2011). Une étude récente rapporte que les cellules FoxP3⁺ peuvent se différencier en lymphocytes TH17 sous l'action de l'IL-6 et ces ex-FoxP3 TH17 seraient particulièrement délétères en arthrite rhumatoïde (Valmori, Raffin et al. 2010, Komatsu, Okamoto et al. 2014).

La plasticité entre les divers sous-types de CD8 a été beaucoup moins étudiée. Il a toutefois été démontré qu'en présence d'IL-12, les Tc17 peuvent co-exprimer ROR- γ t et T-bet ainsi que l'IL-17 et l'IFN- γ , et ces CD8 double positives présenteraient une augmentation de leur capacité cytolytique (Annibali, Ristori et al. 2011, Tajima, Wakita et al. 2011, Satoh, Tajima et al. 2012).

Par ailleurs, l'IL-17 et l'IFN- γ ayant été démontrées comme non essentielles en EAE, l'encéphalitogénicité des lymphocytes T en SEP et en EAE n'est pas restreinte à la production de ces cytokines mais dépend d'un ensemble de caractéristiques qui peuvent être retrouvées chez plus d'un sous-type de lymphocytes en fonction de l'environnement dans lequel ils se différencient et évoluent. La cytokine GM-CSF, qui peut être produite par les TH1, les TH17 et les CD8, serait critique pour l'induction de l'EAE, les lymphocytes déficients en GM-CSF n'induisant pas l'EAE alors que l'expression de GM-CSF est suffisante pour induire l'EAE à partir de lymphocytes déficients en IL-17 et IFN- γ (McQualter, Darwiche et al. 2001, Ponomarev, Shriver et al. 2007, Codarri, Gyulveszi et al. 2011, El-Behi, Ciric et al. 2011). L'IL-23 et l'IL-1 β augmenteraient la production de GM-CSF (El-Behi, Ciric et al. 2011). Le GM-CSF serait crucial pour la sécrétion d'IL-23 et d'IL-6 par les cellules dendritiques et donc pour la génération et la survie des TH17 (Sonderegger, Iezzi et al. 2008). La déficience en T-

bet n'affecte pas la production de GM-CSF (Grifka-Walk, Lalor et al. 2013, O'Connor, Cambrook et al. 2013, Spath and Becher 2013). Toutefois, le transfert de cellules polarisées avec l'IL-12 n'est pas modifié par l'administration d'anticorps anti-GM-CSF, alors que le transfert de cellules polarisées en présence d'IL-23 est amélioré par les anticorps anti-GM-CSF (Kroenke, Carlson et al. 2008).

L'impact sur la BHE et les cellules résidentes du SNC des différentes cytokines et autres facteurs inflammatoires exprimés par les lymphocytes T activés en SEP sera revu dans la prochaine section.

Chapitre 4. Interaction des lymphocytes inflammatoires avec la BHE et le SNC en SEP

Puisque la BHE restreint l'accès des cellules immunitaires au SNC en condition physiologique, la capacité des différents sous-types de lymphocytes à activer la BHE, à la déstabiliser, à la franchir, à recruter d'autres cellules immunitaires vers le SNC et à engendrer l'activation et la destruction des cellules du SNC détermine leur encéphalitogénicité. En effet, en SEP on suppose qu'une dysfonction de la BHE au niveau des veinules du SNC, secondaire à l'activation gliale et/ou à l'activation immunitaire périphérique, permet l'entrée dans l'espace périvasculaire de lymphocytes T mémoire effecteurs (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000). Une fois dans l'espace périvasculaire, ces lymphocytes pourront être réactivés par des cellules dendritiques ou des lymphocytes B agissant comme présentateurs d'antigènes, avant d'envahir le parenchyme cérébral via la sécrétion d'enzymes lytiques (Agrawal, Anderson et al. 2006, Agrawal, Lau et al. 2008, Owens, Bechmann et al. 2008, Agrawal, Silva et al. 2011). La sécrétion de cytokines pro-inflammatoires, d'enzymes lytiques, d'espèces réactives de l'oxygène et d'anticorps par les cellules infiltrantes active et endommage les cellules résidentes du SNC et recrute d'autres cellules immunitaires périphériques, en plus d'augmenter la perméabilité de la BHE et de contribuer à la mise en circulation d'antigènes du SNC (Figure 5) (Noseworthy, Lucchinetti et al. 2000, Frohman, Racke et al. 2006, Goverman 2009). Dans ce dernier chapitre, l'activation et le bris de la BHE et des cellules du SNC par les lymphocytes T activés à travers l'expression des cytokines pro-inflammatoires caractéristiques des TH1, TH17 et CD8, l'expression d'enzymes et la génération de ROS sera revue (Larochelle, Alvarez et al. 2011).

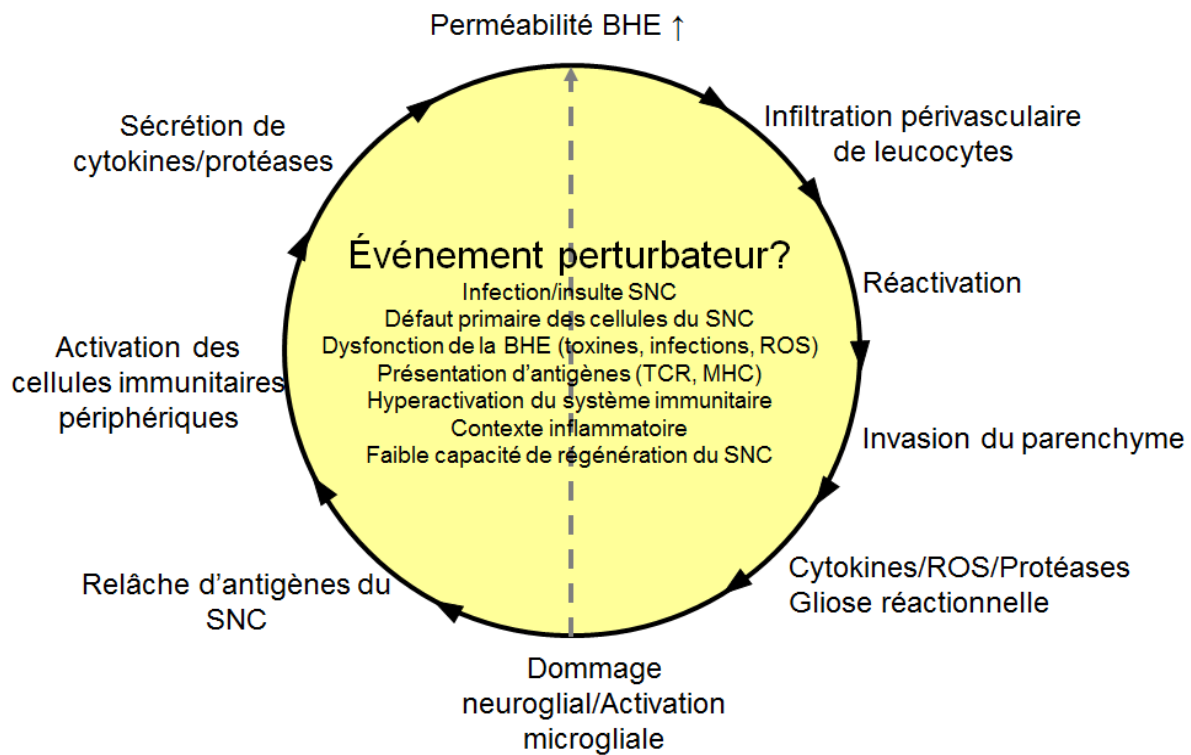


Figure 6 : Représentation schématique de la pathophysiologie de la SEP

Abbréviations : ROS = 'Reactive Oxygen Species'; BHE = barrière hémato-encéphalique; SNC = système nerveux central

4.1 Cytokines

4.1.1 TNF

BHE

Le TNF seul ou en combinaison avec l'IFN- γ peut augmenter la perméabilité de la BHE (Tsuge, Yasui et al. 2010), possiblement en altérant l'architecture des protéines de jonctions inter-endothéliales (Alvarez, Cayrol et al. 2011, Larochelle, Alvarez et al. 2011). Le TNF peut augmenter l'expression de 'Toll-like receptors' par l'endothélium de la BHE, et leur stimulation altère l'expression des protéines de jonctions serrées (Nagyoszi, Wilhelm et al. 2010). De plus, le TNF augmente l'expression des chimiokines CCL2, CXCL8 et CCL5

(Wosik, Biernacki et al. 2007, Subileau, Rezaie et al. 2009). De façon synergique avec l'IFN- γ , il induit de plus l'expression de CCL3, CCL4, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL20 CX3CL1 (Quandt and Dorovini-Zis 2004, Zozulya, Reinke et al. 2007, Chui and Dorovini-Zis 2010, Holman, Klein et al. 2011, Griffin, Newton et al. 2012). Plusieurs molécules d'adhérence sont exprimées par les cellules endothéliales de la BHE en réponse au TNF et à l'IFN- γ , entre autres ICAM-1 (Wong and Dorovini-Zis 1992, Wosik, Biernacki et al. 2007, Zeni, Doepker et al. 2007, Griffin, Newton et al. 2012), VCAM-1 (Wong and Dorovini-Zis 1995, Zeni, Doepker et al. 2007, Griffin, Newton et al. 2012), ALCAM (Cayrol, Wosik et al. 2008), E- et P-selectins (Carvalho-Tavares, Hickey et al. 2000, Wong, Prameya et al. 2007, Larochelle, Alvarez et al. 2011). La combinaison TNF et IFN- γ augmenterait le recrutement des lymphocytes T mais pas des neutrophiles (Griffin, Newton et al. 2012).

SNC

L'exposition des péricytes au TNF augmente leur expression de VCAM-1 (Balabanov, Beaumont et al. 1999) et pourrait induire leur apoptose (Alikhani, Roy et al. 2010). La microglie activée peut sécréter le TNF et contribuer ainsi à la dysfonction de la BHE (Nishioku, Matsumoto et al. 2010). En combinaison avec l'IFN- γ , le TNF augmente l'expression des chimiokines CXCL9, CXCL10 et CXCL11 par les astrocytes (Kang, Altuntas et al. 2010, Hashioka, Klegeris et al. 2011), et en combinaison avec l'IL-17 il augmente l'expression de CXCL1, CXCL2 et CCL20 (Kang, Altuntas et al. 2010).

4.1.2 IFN- γ

BHE

En plus des effets en combinaison avec le TNF mentionnés ci-haut, l'IFN- γ seul peut augmenter CXCL10 (Ifergan, Wosik et al. 2006, Subileau, Rezaie et al. 2009).

SNC

L'IFN- γ augmente l'apoptose des oligodendrocytes médiée par Fas ligand et par la staurosporine, alors qu'il protège contre les le stress oxydatif (Balabanov, Strand et al. 2006, Balabanov, Strand et al. 2007, Pierson, Simmons et al. 2012). L'IFN- γ induit l'expression de MHC classe I par toutes les cellules résidentes du SNC, de MHC classe II par la microglie, les

astrocytes et les péricytes, celle d'ICAM-1 par les péricytes et les astrocytes, celle de CXCL11 par les astrocytes (Shrikant and Benveniste 1996, Balabanov, Beaumont et al. 1999, Neumann, Medana et al. 2002, Hashioka, Klegeris et al. 2011) et celle de CXCL2 par les astrocytes exclusivement au niveau spinal (Simmons, Liggitt et al. 2014). Il pourrait toutefois avoir un effet neuroprotecteur (Ryu, Kim et al. 2010) et anti-inflammatoire à travers l'augmentation de l'expression d'un inhibiteur de l'IL-18 par la microglie (Millward, Lobner et al. 2010) et l'augmentation de 'l'astrocyte-derived immune suppressor factor' (Hara, Nanri et al. 2011), ainsi que l'inhibition de la sécrétion de CXCL2 par les astrocytes cérébraux (Simmons, Liggitt et al. 2014).

4.1.3 IL-17

BHE.

L'IL-17 déstabilise la BHE en diminuant l'expression d'occludine et en menant à une désorganisation de l'expression de zona occludens 1, en plus d'augmenter la formation de ROS par l'endothélium et d'ainsi perturber la contractilité des cellules endothéliales de la BHE (Kebir, Kreymborg et al. 2007, Huppert, Closhen et al. 2010). L'IL-17 augmente également la production de CCL2, IL-6 et CXCL8 par l'endothélium (Kebir, Kreymborg et al. 2007). Au niveau de l'endothélium cardiaque, l'IL-17, de façon synergique avec le TNF, augmente l'expression de P-selectin et E-selectin, des chimiokines neutrophiliques CXCL1, CXCL2 et CXCL5 et des cytokines GM-CSF et de G-CSF, causant une augmentation de la migration des neutrophiles sur l'endothélium périphérique (Griffin, Newton et al. 2012). Il reste à démontrer si de telles observations peuvent être applicables aux cellules endothéliales de la BHE.

SNC

La sécrétion d'IL-23 au sein du SNC par la microglie activée, les cellules dendritiques et les macrophages infiltrants promeut l'expansion des TH17 (Li, Chu et al. 2007). L'IL-17 en soi agirait sur la microglie en augmentant sa production d'IL-6 et de CXCL2 (Kawanokuchi, Shimizu et al. 2008, Das Sarma, Ciric et al. 2009) ainsi que sur les astrocytes en induisant leur expression des cytokines IL-6 et IL-1 β (Trajkovic, Stosic-Grujicic et al. 2001) et de la chimiokine CXCL2 (Simmons, Liggitt et al. 2014). Avec l'IL-6, l'IL-17 induirait les

astrocytes à produire l'IL-12 et les chimiokines CCL2, CXCL10 et CCL20 (Ma, Reynolds et al. 2010). L'IL-17 combiné au TNF augmente l'apoptose des oligodendrocytes secondaire au stress oxydatif (Paintlia, Paintlia et al. 2011). En combinaison avec l'IFN- γ et le TNF ou l'IL-1 β , l'IL-17 augmente également la production de NO des astrocytes (Trajkovic, Stosic-Grujicic et al. 2001). Les TH17 pourraient former des contacts prolongés avec les neurones et induire un influx de calcium intracellulaire, marqueur précoce de détresse neuronale. Toutefois, ce phénomène serait vraisemblablement contact-dépendant et non pas lié à un facteur soluble comme l'IL-17 (Siffrin, Radbruch et al. 2010). Finalement, les TH17 induiraient la formation de follicules lymphoïdes ectopiques au sein du SNC entre autres par la sécrétion d'IL-17 et l'expression de la molécule de surface podoplanine (Peters, Pitcher et al. 2011).

4.1.4 GM-CSF

BHE

Le récepteur du GM-CSF serait exprimé au niveau de la BHE et l'endothélium de la BHE peut sécréter le GM-CSF (Simka 2009, Alvarez, Katayama et al. 2013). Toutefois, son impact sur l'endothélium cérébral n'est pas encore bien défini. Le GM-CSF augmenterait la transcytose du virus HIV à travers la BHE (Dohgu, Fleegal-DeMotta et al. 2011). En périphérie, il induit l'expression de VEGF et augmente l'angiogénèse (Zhao, Chen et al. 2014). Le GM-CSF promeut la survie des neutrophiles (Franzen, Bouhy et al. 2004). Il pourrait toutefois contrecarrer l'effet du TNF sur l'expression d'ICAM-1 et de VCAM-1 en périphérie (Tisato, Secchiero et al. 2013). En EAE, son principal aspect pro-inflammatoire se situe au niveau de l'activation et du recrutement des cellules myéloïdes périphériques (Codarri, Gyulveszi et al. 2011).

SNC

Le GM-CSF peut traverser la BHE ou être sécrété par les astrocytes. Dans le SNC, il peut agir sur son récepteur exprimé par les oligodendrocytes, les astrocytes, la microglie et les neurones (Franzen, Bouhy et al. 2004). Le GM-CSF augmenterait l'expression de MHC classe II et la production de cytokines pro-inflammatoires par la microglie, notamment l'IL-6 (Franzen, Bouhy et al. 2004, Codarri, Gyulveszi et al. 2011, Pierson, Simmons et al. 2012). Le

GM-CSF présenterait au contraire des propriétés neuroprotectrices dans un modèle de Parkinson (Mangano, Peters et al. 2011) et d'ACV (Schabitz, Kruger et al. 2008).

4.1.5 GzB et perforine

BHE

La perforine pourrait augmenter l'expression de VEGF par les neurones, qui à son tour diminuerait l'occludine (Suidan, Dickerson et al. 2010). Sécrétée par les CD8, elle contribue à la dysfonction de la BHE en encéphalomyélite virale de Theiler (Suidan, McDole et al. 2008, Johnson, Jin et al. 2014). La perforine a également été impliquée dans l'apoptose des cellules endothéliales de la BHE dans un modèle de parasitose (Potter, Chan-Ling et al. 2006). Au contraire, les CD8 activés exprimant GzB n'augmenteraient pas la perméabilité de la BHE (Schneider, Mohebiany et al. 2011) et n'entraîneraient pas d'augmentation de la mort cellulaire endothéliale *in vitro* (Ifergan, Kebir et al. 2011).

SNC

Des CD8 présentant des granules cytotoxiques polarisés vers les neurones et les oligodendrocytes sont retrouvés au sein des lésions de SEP (Neumann, Medana et al. 2002). *In vitro*, les CD8 cytotoxiques peuvent lyser les oligodendrocytes (Friese and Fugger 2005, Goverman, Perchellet et al. 2005, Goverman 2009), toutefois la perforine n'est pas essentielle en EAE (Goverman 2009) et ne semble pas neurotoxique en soi (Wang, Allie et al. 2006). Au contraire, le GzB clive la transaldolase oligodendrocytaire et est neurotoxique (Wang, Allie et al. 2006, Niland, Miklossy et al. 2010). Les TH17 humains qui expriment GzB sont capables de tuer les neurones *in vitro* (Kebir, Kreymborg et al. 2007). Le GzB ne présente cependant pas de toxicité pour les astrocytes (Wang, Allie et al. 2006).

4.2 Enzymes

BHE

Les lymphocytes T activés peuvent sécréter directement des MMPs, les induire à travers l'expression de 'extracellular MMP inducer' (EMMPRIN ou CD147) ou recruter des

macrophages exprimant des MMPs (Parks, Wilson et al. 2004, Agrawal, Silva et al. 2011, Larochelle, Alvarez et al. 2011). Par exemple, des lignées de CD8 dérivés de patients SEP et spécifiques pour des peptides de PLP peuvent sécréter MMP-9 et digérer la gélatine (Biddison, Taub et al. 1997). De plus, le sérum de patients SEP en poussée ou en progression secondaire réduit l'expression de claudine-5, vraisemblablement à travers l'induction de la sécrétion de MMP-2 et -9 par les cellules endothéliales de la BHE (Biddison, Taub et al. 1997). Les MMPs peuvent dégrader les protéines de jonctions et les protéines des matrices extracellulaires (lames basales) de la BHE, en plus de réguler l'activation de chimiokines, cytokines et molécules d'adhérence (Hummel, Kallmann et al. 2001, Overall, McQuibban et al. 2002, Sultan, Gosling et al. 2004, Agrawal, Anderson et al. 2006, Rosenberg and Yang 2007, Sithu, English et al. 2007, Agrawal, Lau et al. 2008, Alvarez and Teale 2008, Liu, Hendren et al. 2009). Le TNF augmenterait l'activité des MMPs au niveau de l'épithélium du plexus choroïdien (Zeni, Doepker et al. 2007). De leur côté, les MMPs pourraient cliver le TNF et ainsi favoriser la relâche de sa forme active (Gearing, Beckett et al. 1994).

SNC

Les MMPs clivent le dystroglycan impliqué dans l'ancrage des pieds astrocytaires à la membrane basale (Agrawal, Anderson et al. 2006). La neutralisation d'EMMPRIN sur les lymphocytes T activés réduit leur neurotoxicité (Agrawal, Silva et al. 2012). L'expression de MMP-9 par certains neurones expliquerait en partie leur vulnérabilité dans un modèle de sclérose latérale amyotrophique (Kaplan, Spiller et al. 2014), en post-ischémie (Kim and Lee 2014) et également en EAE (Jiang, Wu et al. 2013), toutefois l'impact des lymphocytes T activés sur l'expression et l'activité de MMPs neuronales demeure à déterminer. Les microglies peuvent exprimer différentes MMPs de façon constitutive. En SEP, l'expression de MMPs est retrouvée dans les nodules microgliaux (Maeda and Sobel 1996, Larochelle, Alvarez et al. 2011). Les astrocytes peuvent exprimer de façon modérée les MMP-2, -7 et -9 en milieu non pathologique et les MMP-2, -3 et -9 en SEP mais l'augmentation d'expression d'inhibiteurs des MMPs par les astrocytes péri-lésionnels suggère un rôle plutôt anti-inflammatoire en SEP (Maeda and Sobel 1996, Pagenstecher, Stalder et al. 1998).

4.3 Dérivés réactifs de l'oxygène ('Reactive oxygen species')

BHE

Les cytokines pro-inflammatoires, notamment l'IL-17, causent une augmentation des ROS à travers l'activation des cellules endothéliales de la BHE et le recrutement de monocytes et macrophages (Huppert, Closhen et al. 2010, Larochelle, Alvarez et al. 2011). Les ROS causent une altération de la phosphorylation des protéines de jonctions et de l'expression d'occludine et de zona occludens-1, ainsi qu'une diminution de l'expression de claudine-5, résultant en une BHE plus permissive et une augmentation de la transmigration leucocytaire (Olesen 1987, Imaizumi, Kondo et al. 1996, Van der Goes, Wouters et al. 2001, Lee, Namkoong et al. 2004, Haorah, Knipe et al. 2005). Les ROS peuvent également mener à une augmentation de l'expression de molécules d'adhérence par l'endothélium de la BHE (Rattan, Sultana et al. 1997, Kim, Bae et al. 2008).

SNC

Les macrophages infiltrant le SNC, la microglie et les astrocytes peuvent produire des ROS lorsqu'en milieu inflammatoire comme en SEP, entre autres en présence d'IL-17, IFN- γ , IL-1 β ou TNF (van der Goes, Brouwer et al. 1998, Trajkovic, Stosic-Grujicic et al. 2001, Gray, Thomas et al. 2008, van Horssen, Witte et al. 2011, Honorat, Kinoshita et al. 2013). Les ROS peuvent participer à la démyélinisation et à la perte d'oligodendrocytes et de neurones, entre autres en entraînant une dysfonction mitochondriale qui à son tour exacerbe la production de ROS (Larochelle, Alvarez et al. 2011, di Penta, Moreno et al. 2013, Honorat, Kinoshita et al. 2013, Khan, Dine et al. 2014, Lassmann 2014). Toutefois, les microglies peuvent également participer à la défense contre le stress oxydatif en SEP en augmentant leur expression de catalase (Gray, Kemp et al. 2014).

La figure 6 illustre les différents mécanismes par lesquels les leucocytes périphériques peuvent déstabiliser la BHE en SEP et ainsi parvenir à atteindre le parenchyme du SNC, où ils s'accumulent et causent la perte d'oligodendrocytes et de neurones, entraînant des déficits neurologiques initialement partiellement réversibles mais cumulatifs au long cours chez les patients atteints de SEP.

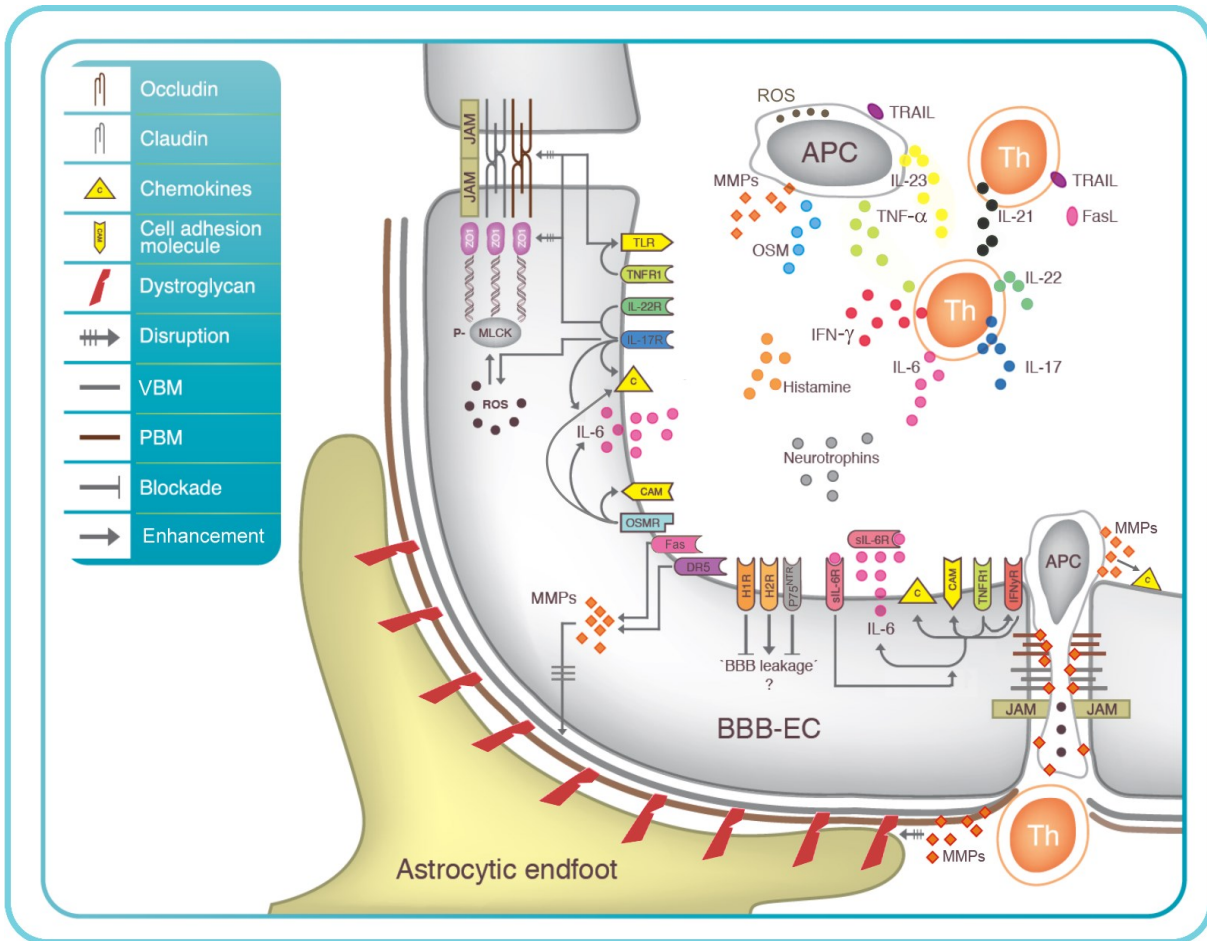


Figure 7: Effet des cytokines, ‘reactive oxygen species’ (ROS) et métalloprotéinases matricielles (MMPs) produites par les cellules immunitaires périphériques qui peuvent directement endommager les composantes de la BHE

Liste des abréviations: APC: antigen-presenting cell; BBB-EC: blood-brain barrier endothelial cell; CAM: cell adhesion molecule; C: chemokine; DR5: death receptor 5; FasL: Fas ligand; H1R: histamine receptor 1; H2R: histamine receptor 2; IFN γ R: interferon- γ receptor; IL: interleukin; JAM: junctional adhesion molecules; MMPs: matrix metalloproteinases; MLCK: myosin light chain kinase; NTR: neurotrophin receptor; OSMR: oncostatin M receptor; PBM: parenchymal basement membrane; P: phosphorylated; R: receptor; ROS: reactive oxygen species; sIL-6R: soluble IL-6 receptor; Th: T helper lymphocyte; TLR: Toll-like receptor; TNFR1: tumor necrosis factor receptor 1; TRAIL: TNF-related apoptosis-inducing ligand; VBM: vascular basement membrane; ZO1: zona occludens 1. Reproduit avec permission (Larochelle, Alvarez et al. 2011).

Hypothèses et objectifs

Préambule

Un leucocyte activé exprimant des facteurs pro-inflammatoires induisant l'expression de molécules d'adhérence, l'activation de chimiokines et la déstabilisation de jonctions serrées de la BHE, capable de digérer les composantes des lames basales, d'activer les cellules du SNC et d'endommager les cellules neurogliales, ainsi que favorisant le recrutement à travers la BHE vers le SNC d'autres populations leucocytaires pro-inflammatoires, serait considéré comme hautement pathogénique en SEP et une cible de choix pour contrôler la maladie. La restriction spécifique de l'entrée dans le SNC des leucocytes pathogéniques constituerait une approche thérapeutique idéale en SEP, permettant de réduire la formation de lésions tout en préservant les capacités de défense et surveillance immunitaire systémiques et propres au SNC. L'identification et la caractérisation de molécules d'adhérence exprimées spécifiquement par les lymphocytes TH17 et utilisées par ces derniers pour traverser la BHE et participer à la formation de lésions inflammatoires du SNC en EAE et en SEP est donc le premier objectif de ce projet de doctorat et l'objet du premier manuscrit présenté.

Afin d'identifier une molécule d'adhérence susceptible d'être utilisée par les lymphocytes TH17 pour atteindre le SNC en SEP, deux analyses protéomiques effectuées préalablement par l'équipe du Dr Prat en vue de découvrir de nouvelles cibles thérapeutiques en SEP ont été utilisées: l'analyse de radeaux lipidiques extraits de cellules endothéliales humaines de la BHE en culture primaire (Cayrol, Wosik et al. 2008) et celle de lymphocytes T CD4 mémoire humains polarisés en TH17 (données non publiées). La molécule MCAM (melanoma cell adhesion molecule), également appelée CD146, S-endo-1 ou MUC18, a été identifiée dans ces deux analyses protéomiques.

MCAM a été premièrement décrite comme un antigène membranaire exprimé par les mélanomes malins, en particulier métastatiques (Lehmann, Holzmann et al. 1987). MCAM est une glycoprotéine de 113 à 118 kDa membre de la superfamille des immunoglobulines. Elle présente des similarités de séquence avec les molécules d'adhérence ICAM-1 et NCAM (neural cell adhesion molecule) (Johnson, Lehmann et al. 1989, Lehmann, Riethmuller et al.

1989, Bardin, Frances et al. 1996). MCAM comporte 5 domaines Ig (V-V-C2-C2-C2), une région transmembranaire et une courte 'queue' cytoplasmique (Sers, Kirsch et al. 1993). La séquence d'acides aminés composant le MCAM murin est 76.2% identique à la séquence du MCAM humain (Yang, Wang et al. 2001). Les cellules endothéliales vasculaires expriment MCAM, en particulier lorsqu'activées, en prolifération ou en voie d'atteindre la confluence (Sers, Riethmuller et al. 1994, Bardin, Frances et al. 1996, Bardin, Anfosso et al. 2001). MCAM serait retrouvée au niveau des jonctions intercellulaires et du cytoplasme des cellules endothéliales et sous forme soluble dans le surnageant de cellules endothéliales (Bardin, Frances et al. 1996, Bardin, Frances et al. 1998, Bardin, Anfosso et al. 2001). MCAM est également exprimé par certains lymphocytes T activés (Pickl, Majdic et al. 1997). MCAM interagit avec le cytosquelette d'actine et son expression est associée à une augmentation de l'adhérence des leucocytes aux cellules endothéliales périphériques et à VCAM-1, attribuable entre autres à la formation et à l'extension de microvilli (Bardin, Anfosso et al. 2001, Guezguez, Vigneron et al. 2007, Bardin, Blot-Chabaud et al. 2009, Brucklacher-Waldert, Stuermer et al. 2009). Puisque MCAM pourrait présenter des interactions homotypiques (Guezguez, Vigneron et al. 2007, Staquicini, Tandle et al. 2008) et hétérotypiques (Bardin, Blot-Chabaud et al. 2009), une implication dans les interactions leucocytes-BHE est plausible.

Hypothèse

La première hypothèse est que MCAM est une molécule d'adhérence exprimée par les lymphocytes TH17, qui participe à leur transmigration vers le SNC et qui peut être manipulée *in vivo* pour réduire la sévérité de l'EAE.

L'analyse des lymphocytes circulants exprimant MCAM dans le sang de patients SEP en rémission ou en poussée a permis de révéler que l'expression de MCAM par une population lymphocytaire distincte semble liée à l'activité de la maladie. En effet, durant les poussées une proportion considérable de lymphocytes T CD8 exprime MCAM, alors que la fréquence de lymphocytes T CD8 MCAM⁺ circulants est comparable entre les sujets SEP en rémission et les contrôles sains. Cette observation a mené au deuxième objectif de ce projet de doctorat et fait l'objet du second manuscrit présenté. Il s'agit de la caractérisation de la sous-population

des lymphocytes T CD8 exprimant MCAM et de leur rôle en SEP, afin d'évaluer le potentiel de MCAM comme cible thérapeutique pour réduire l'inflammation au sein du SNC.

La deuxième hypothèse de travail est que MCAM identifie une sous-population encéphalitogénique de lymphocytes T CD8 et que, considérant également la sous-population de lymphocytes T CD4 exprimant MCAM et l'expression de MCAM par les cellules endothéliales de la BHE, neutraliser MCAM pourrait donc constituer une avenue thérapeutique intéressante en SEP.

Résultats : Manuscrit 1

Titre: Melanoma Cell Adhesion Molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system.

Journal: Brain. 2012 Oct;135(10):2906-2924.

Auteurs : Catherine Larochelle, Romain Cayrol, Hania Kebir, Jorge Ivan Alvarez, Marc-André Lécuyer, Igal Ifergan, Émilie Viel, Lyne Bourbonnière, Diane Beauseigle, Simone Terouz, Lamia Hachehouche, Steve Gendron, Josée Poirier, Céline Jobin, Pierre Duquette, Ken Flanagan, Ted Yednock, Nathalie Arbour & Alexandre Prat

Contributions : Le projet a été initié par le Dr Romain Cayrol qui a choisi d'étudier MCAM et a effectué toutes les expériences préliminaires. J'ai poursuivi et développé le projet et réalisé avec l'aide de Lyne Bourbonnière la majorité des mesures *ex vivo*, des expériences *in vitro* et l'ensemble des expériences animales présentées dans le manuscrit. Dr Hania Kebir a participé à l'élaboration, la réalisation et l'analyse de certaines expériences *in vitro* et à la révision du manuscrit. Dr Jorge Ivan Alvarez aidé de Simone Terouz a fourni la plus grande partie des données *in situ* et participé à la révision du manuscrit. Marc-André Lécuyer a réalisé les expériences de flot. Dr Igal Ifergan a participé aux discussions scientifiques, à l'analyse et à l'élaboration de certaines expériences. Dr Viel a analysé et réalisé une expérience de tri. Lamia Hachehouche et Dr Steve Gendron ont participé aux corrections demandées par les réviseurs. Josée Poirier, Dr Pierre Duquette et Dr Céline Jobin ont fourni la majorité des échantillons de sang et de LCR. Dr Ken Flanagan et Dr Ted Yednock ont participé aux discussions scientifiques et ont fourni le Fc-MCAM. Dr Nathalie Arbour, aidée de Diane Beauseigle, a réalisé les analyses par PCR en plus de participer aux discussions scientifiques, à l'élaboration et l'analyse des expériences et à la révision du manuscrit. Toutes les étapes du projet ont été réalisées sous la supervision et la direction du Dr Alexandre Prat. Le manuscrit a été rédigé par le Dr Alexandre Prat, Dr Hania Kebir et moi-même.

**Melanoma Cell Adhesion Molecule identifies
encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the
central nervous system.**

Catherine Larochelle^{1,2}, Romain Cayrol¹, Hania Kebir¹, Jorge Ivan Alvarez¹, Marc-André Lécuyer¹, Igal Ifergan¹, Émilie Viel¹, Lyne Bourbonnière¹, Diane Beauseigle¹, Simone Terouz¹, Lamia Hachehouche¹, Steve Gendron¹, Josée Poirier², Céline Jobin², Pierre Duquette², Ken Flanagan³, Ted Yednock³, Nathalie Arbour¹ & Alexandre Prat^{1,2}

1- Neuroimmunology Research Laboratory, Center of Excellence in Neuromics, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada.

2- Multiple Sclerosis Clinic, Department of Neurology, Université de Montréal, CHUM-Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, Canada.

3- Elan Pharmaceuticals, 1000 Gateway Blvd, South San Francisco, CA 94080.

Corresponding author:

A. Prat MD, PhD,

Running title: MCAM in multiple sclerosis

Keywords: MCAM (CD146), multiple sclerosis, TH17, blood-brain barrier, EAE, IL-23, leukocyte transmigration, adhesion, diapedesis.

Total number of words in the manuscript: 7956

Abstract

In multiple sclerosis, encephalitogenic CD4⁺ lymphocytes require adhesion molecules to accumulate into central nervous system inflammatory lesions. Using proteomic techniques, we identified expression of melanoma cell adhesion molecule (MCAM) on a subset of human effector memory CD4⁺ lymphocytes and on human blood-brain barrier endothelium. Herein, we demonstrate that MCAM is a stable surface marker that refines the identification of IL-17⁺, IL-22⁺, ROR- γ and IL-23Receptor⁺ cells within the CD161⁺CCR6⁺ subset of memory CD4⁺ lymphocytes. We also show that MCAM⁺ lymphocytes express significantly more GM-CSF and granzyme B than MCAM^{negative} lymphocytes. Furthermore, the proportion of MCAM⁺ CD4⁺ lymphocytes is significantly increased in the blood and in the central nervous system of multiple sclerosis patients and experimental autoimmune encephalomyelitis animals as compared to healthy controls or other neurological diseases, and MCAM expression is upregulated at the blood-brain barrier within inflammatory lesions. Moreover, blockade of MCAM or depletion of MCAM⁺ CD4⁺ T lymphocytes both restrict the migration of TH17 lymphocytes across blood-brain barrier endothelial cells and decrease the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. Our findings indicate that MCAM could serve as a potential biomarker for multiple sclerosis and represents a valuable target for the treatment of neuroinflammatory conditions.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is a neuroinflammatory disorder characterized by immune cell infiltration into the central nervous system (CNS). In MS, multifocal immune infiltrates are associated with areas of demyelination, gliosis and axonal loss, and are largely responsible for the recurrent clinical symptoms (Sospedra and Martin, 2005). The nature of the immune cells responsible for CNS damage in MS is still a matter of debate. While T-bet-expressing T helper (TH) 1 CD4⁺ T lymphocytes were originally incriminated as disease-inducing T lymphocytes (Yang et al., 2009), ROR- γ -expressing TH17 CD4⁺ lymphocytes have recently emerged as a highly inflammatory subset associated with MS and its animal model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) (Bettelli et al., 2006; Kebir et al., 2009; Kebir et al., 2007; Korn et al., 2009; Langrish et al., 2005; Tzartos et al., 2008). TH17 lymphocytes are more abundant in the peripheral blood (PB) and cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients (Alexander et al., 2010; Babaloo et al., 2010; Brucklacher-Waldert et al., 2009; Durelli et al., 2009; Frisullo et al., 2008; Li et al., 2011; Matusевич et al., 1999) as compared to controls, cross the blood-brain barrier (BBB) more readily than TH1 lymphocytes (Kebir et al., 2007) and have been associated with a higher disease burden in the brain (Stromnes et al., 2008). TH17 lymphocytes generated in the presence of IL-23 express ROR- γ IL-17, IL-22 and GM-CSF and display a great encephalitogenic potential in mouse, according to recent studies (Awasthi et al., 2009; Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011; Ghoreschi et al., 2010; Hirota et al., 2011).

To gain access to the CNS parenchyma, immune cells of the PB need to cross vascular barriers of the CNS. Under physiological conditions, the BBB limits access of leukocytes to the CNS parenchyma, such that only a few leukocytes can enter and exert immune surveillance (Hickey, 2001; Mrass and Weninger, 2006). Under inflammatory conditions, the interaction of BBB-endothelial cells (BBB-ECs) with leukocytes via expression of cell adhesion molecules (CAMs) contributes to leukocyte transmigration in the CNS parenchyma, an early event in the development of CNS inflammation (Engelhardt, 2006; Man et al., 2007; Mrass and Weninger, 2006). The importance of these BBB-leukocyte interactions has been demonstrated by the clinical efficacy of α 4 β 1 integrin blockade as a treatment for MS (Polman et al., 2006). However, serious adverse events can arise because of the resulting restriction of

immunosurveillance (Ransohoff, 2005), which points to the need to identify molecules involved specifically in the recruitment of encephalitogenic immune cell populations through the BBB.

Melanoma cell adhesion molecule (MCAM or CD146) is an adhesion molecule of the immunoglobulin superfamily (Sers et al., 1993). MCAM is expressed by peripheral ECs and by a discrete IL-17-producing T cell population (Brucklacher-Waldert et al., 2009; Dagur et al., 2011; Elshal et al., 2005). Although its exact role remains to be determined, MCAM can reportedly interact with itself (homotypic interaction) (Staquicini et al., 2008) and with a yet unidentified ligand (heterotypic interaction) (Bardin et al., 2009). MCAM has been implicated in different melanoma-dependent processes such as tumour growth, invasiveness, metastasis, homotypic and heterotypic cell adhesion and increased matrix metalloproteinase (MMP) activity (Bu et al., 2006; Mills et al., 2002; Xie et al., 1997). More recently, MCAM was reported to be involved in the rolling, adhesion and migration of leukocytes across peripheral non-CNS ECs (Bardin et al., 2009; Brucklacher-Waldert et al., 2009; Guezzuez et al., 2007) and in VEGF-induced angiogenesis (Zhuang et al., 2010).

In the current manuscript, we demonstrate that MCAM is expressed by BBB-ECs and by a highly inflammatory and disease-inducing subset of effector memory T lymphocytes. We show that MCAM is up-regulated under inflammatory conditions both on BBB-ECs and on T lymphocytes, is strongly associated with ROR- γ , IL-23R, IL-17, IL-22, GM-CSF and granzyme B (GzB) expression by CD4⁺ lymphocytes and is more abundant in the PB and CSF of MS patients, as compared to healthy controls (HC). Moreover, MCAM modulation *in vivo* restricts the adhesion and migration of TH17 lymphocytes and has a significant impact on the clinical and pathological severity of EAE. Therefore, our data identify MCAM as a potential biomarker for MS and as a valuable therapeutic target for the treatment of T lymphocyte-dependent CNS inflammation, as occurs in MS patients.

Material and Methods

BBB-EC isolation and culture

BBB-ECs were isolated from non-epileptic surgical human CNS material (resection path) according to a previously published protocol (Cayrol et al., 2008; Ifergan et al., 2006; Kebir et al., 2007). Informed consent and ethic approval were given prior to surgery (CHUM research ethic committee approval number HD04.046). Characterization and purity was performed as previously published.

Reverse Transcription-PCR

RNA from BBB-ECs and HUVECs cells was extracted with Trizol reagent (Invitrogen). Reverse transcription reaction was performed using M-MLV reverse transcriptase (Invitrogen). PCR reaction was performed using specific primers to amplify human MCAM cDNA (MCAM 1338 Forward →5'-GAGAGGAAGGTGTGGGTGAA-3' and MCAM 1677 Reverse ←5'-TCTCTGTGGAGGTGCTGTTG-3', product length = 340 bp). Primers used to amplify β-actin cDNA were β-actin 769 Forward →5'-ACGGCTGCTTCCAGCTCCTC-3' and β-actin 1293 Reverse ←5'-AGCCATGCCAATCTCATCTTGT-3', product length = 525 bp. PCR amplification was performed at 25 cycles with the following conditions: denaturation at 94°C for 45 sec, annealing at 60°C for 45 sec and elongation at 72°C for 1 min. PCR reactions were run on 2% agarose gel and visualized by ethidium bromides staining.

Western blot

Forty micrograms of BBB-EC lysate was analyzed by standard SDS-PAGE (Wosik et al., 2007) using anti-MCAM (mouse monoclonal P1H12, 1/100, Chemicon). Specific binding was revealed with horseradish peroxydase (HRP)-conjugated anti-rabbit (1/1,000, DakoCytomation) using the ECL system (Amersham Biosciences). β-actin (1/20000, Sigma) was used as a loading control.

Human immune cell isolation, expansion and culture

Venous blood samples were obtained from consenting healthy donors, MS patients and other neurological diseases (OND), in accordance with institutional guidelines (CHUM research ethic committee approval number SL05.022 and 023 and BH07.001), and immune cells were isolated as previously published (Ifergan et al., 2008). In brief, PBMCs were obtained using density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (GE Healthcare). Human CD14+ monocytes

(positive selection), memory CD4+CD45RO+ (negative selection) and MCAM+ and MCAMneg lymphocytes (positive selection) were isolated using the MACS isolation columns (or when specified using FACS-sorting) either *ex vivo* or after culture as indicated, according to the manufacturer's protocol (Miltenyi). Immune cell purity was assessed by flow cytometry using fluorochrome-labeled anti-CD14 (FITC), anti-CD45RO (PE), anti-CD146 (APC), anti-CD3 (A700) and anti-CD4 (PeCy7) (all antibodies from BD Pharmingen except anti-CD146 from Miltenyi Biotec clone 541-10B2) and was routinely >95%. CD4+CD45RO+ lymphocytes were labeled when necessary with the vital dye 5,6-carboxyfluorescein diacetate succinimidyl ester (CFSE) as previously published (Ifergan et al., 2008). T lymphocytes were cultured as previously published (Kebir et al., 2007). Briefly 0.5X10⁶ cells/ml were cultured with either autologous monocytes at a 1:0.6 ratio and soluble anti-CD3 (eBioscience, clone OKT3, 2.5 µg/ml), or with plate-bound anti-CD3 (2.5 µg/ml incubated 24h hours at 4°C) and soluble anti-CD28 (BD Pharmingen, 2 µg/ml) in X-vivo 15 medium (Lonza) without serum and supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Sigma). For TH17 differentiation rhIL-23 (25 ng/ml), anti-hIL-4 antibody (5 µg/ml) and anti-hIFN-γ antibody (5 µg/ml) were added, whereas IL-12 (10 ng/ml) in the presence of anti-IL-4 was added for TH1 differentiation, IL-4 (200 ng/ml) in the presence of anti-IFN-γ and anti-IL-12 antibodies (5 µg/ml) for TH2 differentiation and IL-2 (20 U/ml) in the presence of anti-IL-4 and anti-IFN-γ antibodies was added for non specific stimulation, and cells were harvested at day 6 if not specified otherwise (all reagents from R&D Systems). To study the influence of cytokines on MCAM expression assay, CD4+CD45RO+MCAM- lymphocytes were cultured with plate-bound anti-CD3 and soluble anti-CD28 and only the specified cytokine was added daily: rhIL-2 (20U/ml), rhIL-17 (100 ng/ml), rhGM-CSF (20 ng/ml, BD Biosciences), rhIL-12 (20 ng/ml, R&D Systems), TNF (10U/ml), IFN-g (10 U/ ml), IL-1β (10ng/ml) or rhIL-23 (25 ng/ml), or PBS for 6 days. When indicated, memory CD4+CD45RO+ were flow cytometry-sorted *ex vivo* in 4 different populations of CCR6+CD161+MCAM+, CCR6+CD161+MCAMneg, CCR6negCD161netMCAM+ and CCR6negCD161negMCAMneg using anti-CD161 (FITC), anti-CCR6 (PE), anti-MCAM (APC) and anti-CD4 (PB) (all antibodies from BD Pharmingen except anti-MCAM Miltenyi Biotec), and then analyzed by qPCR or activated *in vitro*. Due to the small size of the MCAM+ populations, when culture was performed 1X10⁶ lymphocytes were put in 200 µl of X-vivo medium in 96-wells pre-

coated with anti-CD3, in the presence of soluble anti-CD28 and rh IL-23. Mature dendritic cells were generated from D7 CD14⁺ cells treated with GM-CSF, IL-4 and LPS as previously described (Ifergan et al., 2008), and macrophages were generated from D7 adherent CD14⁺ cells cultured in 10% human serum supplemented medium refreshed every other day. After *in vitro* culture, the proliferation of lymphocytes, the presence of activation markers and the capacity to produce cytokines were assessed by flow cytometry as previously described (Ifergan et al., 2008; Kebir et al., 2009).

Cerebrospinal fluid (CSF) samples

CSF samples were obtained from consenting MS patients and OND subjects undergoing spinal tap for clinical indication, in accordance with institutional guidelines (CHUM research ethic committee approval number SL05.022 and 023 and BH07.001). Samples were centrifuged (1600 rpm x 6 min, room temperature) to isolate cells from supernatant and cells were then processed for flow cytometry analysis.

Patient classification

Patient were classified according to McDonald's revised criteria (Polman et al., 2005) as clinically isolated syndrome (CIS; $n = 15$), relapsing-remitting MS (RRMS; $n = 60$), primary progressive MS (PPMS; $n = 11$ patients), secondary progressive (SPMS; $n = 7$ patients), benign MS (EDSS ≤ 1.0 after ≥ 10 years of evolution; $n = 4$) or other neurological disease (OND; $n = 24$) or healthy control (HC; $n = 28$) by 2 certified neurologists from the CHUM MS clinic, blinded to the experiment results and with at least 6 months of follow-up after the sample were analyzed for CIS. Patients suffering from CIS or RRMS were further classified as either untreated stable (≥ 3 months after CIS clinical event or last relapse; untreated stable RRMS $n = 27$ and untreated stable CIS $n = 13$) or untreated in 'relapse' (onset of CIS or acute relapse ≤ 2 weeks; acute relapse RRMS = 7 and acute first 'relapse' as CIS $n = 2$) or treated (currently on glatiramer acetate (9 patients) or β -interferon, (14 patients) or high-dose corticosteroids (3 patients) in the last month; RRMS on treatment $n = 26$). Relapse was defined as acute/subacute onset of new neurological deficit lasting more than 48h. Other neurological diseases (OND) included thunderclap headache without subarachnoid hemorrhage, leukoaraiosis, hydrocephalus, trigeminal neuralgia, tympanic hydrops, migraine and subjective sensory symptoms with normal neurological exam, magnetic resonance imaging and CSF analysis.

EAE disease induction, scoring and pathology

EAE was induced as previously published (Kebir et al., 2009). Briefly, female C57BL/6 mice were immunized subcutaneously with 200 µg MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; Sheldon Biotechnology Center) in a 100 µl emulsion of incomplete Freund adjuvant supplemented with 4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis* (Fisher Scientific). Pertussis toxin (500 ng, Sigma-Aldrich) was injected intra-peritoneally (i.p.) on days 0 and 2. Animals were then injected i.p on days 2, 4, 6, 8 and 10 with either Fc-MCAM (gift from Elan, human Fc portion and mouse MCAM protein, 200 µg/200 µl, *n* = 10 animals per group) or isotype control (hIgG, Sigma, 200 µg/200 µl, *n* = 10) or vehicle (PBS, 200 µl, *n*=10). As no difference in clinical scores or CNS pathology was detectable between isotype or vehicle control groups, PBS was used as control for the two subsequent pre-treatment experiments. For the post-treatment experiment, animals were injected i.p. every other day starting at day 11 (post-treatment) with either Fc-MCAM (200 µg/200 µl, *n* = 9 animals) or isotype control (200 µg/200 µl, *n* = 8 animals). The scoring system used was as follows: 0 = normal; 1 = limp tail; 2 = slow righting-reflex; 3 = paralysis of one hindlimb (monoparalysis); 4 = paralysis of both hindlimbs (paraparalysis); 5, moribund (require sacrifice). Mice were scored by an investigator blinded to the treatment group. On day 15, two representative animals from each group of the pre-treatment experiments were sacrificed, and CNS organs, spleen and lymph nodes were recovered and either frozen or processed for cell isolation and flow cytometry analysis as previously described. The spinal cords were stained with Luxol Fast Blue and H&E as previously described (Wosik et al., 2007). Meningeal and parenchymal inflammatory lesions were counted per spinal cord and brain section as described (Kalyvas and David, 2004). Briefly, spinal cord (4 levels: cervical, thoracic, lumbar, sacral) and brain sections were stained with LFB and H&E and inflammatory lesions were visually counted by an investigator blinded to the treatment group. Counts of CD4⁺, MHCII⁺ and F4/80⁺ immune cells among the 10 greatest infiltrates (out of 4 sections from cervical, thoracic, lumbar and sacral levels) were performed for two animals per group using immunofluorescence-stained spinal cord sections. All counts were performed by two investigators blinded to the treatment group. For *in vitro* reactivation of peripheral leukocytes, EAE animals were sacrificed at day 9 post-immunization, spleen and lymph nodes were recovered and leukocytes were isolated and

cultured with MOG₃₅₋₅₅, mIL-23 (20 ng/ml), hTGF- β (5 ng/ml) and anti-IL-4 and anti-IFN- γ antibodies.

EAE transfer: Active EAE was induced as described above except for PTX (200 ng) injected i.p. on day 0 only. On day 9, 30 mice were sacrificed and leukocytes were recovered from LN and spleens as previously described (Kebir et al., 2009). Cells were reactivated for 96h in RPMI supplemented with 10% FBS, non essential amino acids, HEPES and β -ME, in the presence of MOG₃₅₋₅₅ (20 μ g/ml), rmIL-23 (20ng/ml), rhTGF- β (4ng/ml), rmIL-6 (20ng/ml) and anti-mIFN- γ clone XMG1.2 (20 μ g/ml). Cells were then harvested and a negative selection for CD4 T cells was performed (Miltenyi). The total fraction was then incubated in MACS buffer only and ran over an LS column, while the MCAM-depleted fraction was incubated with anti-LSEC beads (Miltenyi) and ran over an LS column (positive selection for MCAM). The effluent was washed in HBSS and 10 millions cells were injected i.p. to the recipient female C57BL/6 animals. On day 2 following transfer, recipient mice were injected with a single PTX (200 ng) dose. The scoring system used was the same as described above.

All procedures were approved by the University of Montreal Animal Care committee and followed guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Flow cytometry and intracellular staining

BBB-ECs treated with IFN- γ and TNF- α (100 U/ml) were recovered in cold PBS and EDTA, and incubated with anti-ICAM-1 (PE), anti-VCAM-1 (FITC) (antibodies from BD Biosciences, respectively clones HA58 and 51-10C9) or anti-MCAM.

For lymphocyte intracellular cytokine staining (ICS), cells were activated for 4h30 unless specified otherwise with 1 μ g/mL ionomycin and 20 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in the presence of 2 μ g/mL brefeldin A (all from Sigma). Cells were stained for surface antigens and were then fixed and permeabilized in 4% (w/v) paraformaldehyde with 0.1% (w/v) saponin in Hank's Balanced Salt Solution for 10 minutes at room temperature. ICS on human cells was performed as previously published (Kebir et al., 2009), briefly cells were incubated with antibodies specific for human IFN- γ in A700 (BD Biosciences), IL-17 in A488 (eBioscience), IL-22 in PE (R&D Systems), Granzyme B in A700 (GzB, BD Biosciences), GM-CSF in PE (BD Biosciences), IL-4 in PE (BD Biosciences) and IL-2 in PE (BD Biosciences) for 30 minutes on ice in PBS buffer containing 0.1% (w/v) saponin, 1% FBS, 0.1% (w/v) NaN₃, followed by two washes and resuspended in staining buffer (1% (v/v) FBS,

0.1% (w/v) NaN_3 in PBS). For mice cells, immune cells isolated from lymph nodes, spleen and CNS were labeled with surface markers CD3 (A700 or PerCpCy5.5), CD4 (FITC), CD8 (PB), CD45 (PerCpCy5.5), (all from BD Biosciences), CD127/IL-7receptor (PerCpCy5.5) from eBioscience and MCAM in FITC or PE (Miltenyi Biotec and BioLegend, clone ME-9F1). ICS included antibodies specific for mouse IL-17 (PE), GM-CSF (PE) and IFN- γ (APC) (BD Biosciences). Appropriate fluorochrome-matched isotype antibodies were used to assess nonspecific background staining. All cell staining were acquired on a BD LSR II (Becton Dickinson) and analyzed using the BD FACSDiva software (BD Bioscience).

Tissue and immunostaining

Post-mortem frozen sections ($n = 20$) from brains of 3 RRMS patients and 4 healthy controls (normal brain tissue from non-epileptic surgical human CNS material) were studied as previously described (Kebir et al., 2009). Freshly frozen sections ($n = 50$) from EAE animals ($n = 10$) sacrificed at day (d) 15 and from age-matched healthy controls ($n = 6$ mice) were studied as previously described (Alvarez and Teale, 2008; Ifergan et al., 2006). Immunocytofluorescence was performed on frozen samples following cytopsin of FACS-sorted MCAM⁺ and MCAM^{neg} memory CD4⁺ T lymphocytes in 25% glycerin, as previously published (Kebir et al., 2009). Briefly, active MS and EAE lesions were identified by Luxol Fast Blue (LFB) and haematoxylin and eosin (H&E) staining and defined as areas of demyelination associated with intense perivascular immune cell infiltration. For immunohistofluorescence, sections were fixed in acetone for 10 minutes and then transferred to ethanol for 5 minutes, hydrated in PBS and blocked with serum 10% (from the same species that the fluorochrome conjugated antibodies were derived) for 30 minutes at room temperature (rt). Sections were incubated at rt for 60 minutes with primary antibodies diluted in 3% species specific serum. Sections were washed 7 times with PBS and 0.05% Tween 20 after antibody incubation. Secondary antibodies were incubated 40 min at rt when necessary. Then, sections were mounted using gelvatol containing Topro-3 (Invitrogen, 1:300) when required. Negative controls using secondary antibodies alone were included in each experiment and found to be negative for staining.

We used the following primary antibodies: rabbit anti-mouse (m) and human (h) MCAM (monoclonal, EPR3208 Abcam, 1:200), rabbit anti-hCav-1 (polyclonal, Santa Cruz Biotechnology, 1:75), mouse anti-hIL-17 (monoclonal, R&D systems, 1:50), rat anti-mIL-17

(monoclonal, BD Pharmingen, clone TC11-18H10, 1:30), rat anti-m and hROR- γ (monoclonal, eBioscience, clone AFKJS-9, 1:10), mouse anti-m and hT-bet (monoclonal-Alexa-647 conjugated, eBioscience, clone eBio4B10, 1:7.5), mouse anti-hCD4 (monoclonal, BD Pharmingen, clone RPA-T4), rat anti-mCD4 (monoclonal, BD Pharmingen, clone RM4-5, 1:70), rat anti-mMHCII (monoclonal, BD Pharmingen, clone 2G9, 1:30), rat anti-mF4/80 (monoclonal, BioLegend, clone BM8, 1:80), rabbit anti-laminin (polyclonal, Dako, 1:200). When appropriate, we used the following secondary antibodies, either donkey anti-rabbit RRX 1:500, goat anti-mouse Alexa488 1:400, donkey anti-mouse A546 1:300, donkey anti-rat Alexa549 1:500 or donkey anti-goat Alexa549 or Alexa488 1:500 all from Jackson Immunoresearch, or goat anti-rabbit Alexa488 1:500 or goat anti-hIgG 1:1000 from Invitrogen. Different anti-MCAM antibodies were compared on human ECs (P1H12 Chemicon 1:50, anti-CD146 antibody Miltenyi 1:50, Monoclonal Rabbit EPR3208 Abcam 1:200) and gave similar results. For both human and mouse to facilitate double and triple stainings, we used the rabbit monoclonal anti-MCAM antibody.

For immunocytofluorescence human BBB-ECs were treated, or not, with IFN- γ and TNF (100 U/ml) for 16 h. Isolated peripheral blood CD4+CD45RO+ T lymphocytes were allowed to adhere for 1 h and cells were then fixed with Ethanol 70%. MCAM and ICAM-1 were detected with anti-MCAM (Monoclonal Rabbit EPR3208 Abcam 1:200) and anti-ICAM-1 (mouse monoclonal, Santa Cruz, 1:100), respectively. F-actin was stained with Phalloidin-alexa 647 (Invitrogen) conjugated and nuclei with Topro-3 (Invitrogen). Fluorescence was visualized and acquired in a Leica Confocal Microscope SP5 platform (Leica Microsystems). Imaging processing and analysis was done using LAS (Leica) and ImageJ (NIH) softwares.

Real Time Quantitative-PCR

For *ex vivo* qPCR studies, isolated CD4+CD45RO+ were FACS sorted using anti-CD146-APC FACS antibody (Miltenyi), yielding purity over 99% (BD FACSAria). This was confirmed by qPCR for MCAM on FACS-sorted MCAM+ and MCAMneg memory lymphocytes, which confirmed MCAM levels more than 50 times higher in lymphocytes sorted as MCAM+. For *in vitro* qPCR studies, CD4+CD45RO+ lymphocytes in culture were harvested at day 6 and magnetically sorted using two consecutive positive selections for MCAM positive cells using anti-CD146 magnetic beads (Miltenyi), resulting in over 95% purity in both MCAM positive and MCAM negative fraction. qPCR was performed as

previously described (Pittet et al., 2011). Briefly, total RNA was extracted using RNeasy Mini kit according to the manufacturer's instruction (Qiagen). RNA samples were transcribed into cDNA using Quantitect Reverse Transcription kit according to the manufacturer's instruction (Qiagen). Relative gene expression levels were determined using primers and TaqMan FAM-labeled MGB probes for MCAM, IL-23R, T-bet, ROR- γ , GATA-3, IFN- γ , IL-17, IL-22, GM-CSF and ribosomal 18S (VIC-labeled probe) (Applied Biosystems) and according to the manufacturer's instruction. qPCR cycling was performed according to the default temperature settings (2 min at 50°C, 10 min at 95°C, followed by 40 cycles of 15 s at 95°C, 1 min at 60°C) in a 7900HT Fast-Real-Time PCR System (Applied Biosystems). Gene-specific mRNA was normalized compared to endogenous control (*18S*).

BBB transmigration assay

A modified Boyden chamber assay was used to model the BBB, as previously reported (Cayrol et al., 2008; Ifergan et al., 2006; Kebir et al., 2007). 3×10^4 BBB-ECs were grown on gelatin-coated 3 μ m pore size Boyden chambers (Collaborative Biomedical Products) in culture media supplemented with 40% astrocyte-conditioned media for 72 h (to confluency). When indicated, antibodies specific for MCAM (P1H12, custom made, Chemicon, 40 μ g/ml) or the appropriate isotype control (mIgG1, custom made, Chemicon, 40 μ g/ml) were added 1 h prior to immune cell migration. A suspension of 1×10^6 d6 TH17 lymphocytes was added to the upper chamber and allowed to migrate for 18h. Absolute number of cells that transmigrated to the lower chamber was then assessed. All conditions were performed in triplicate for each donor. To assess migration of MCAM⁺ and MCAM^{neg} lymphocytes, d6 TH17 lymphocytes were collected and then separated in two groups: MCAM negative fraction where TH17 lymphocytes were depleted from MCAM using anti-CD146 magnetic beads as described (mean purity over 95% as assessed by FACS) and MCAM positive fraction where TH17 lymphocytes were put through a magnetic column in the absence of magnetic beads (mean percentage of cells expressing MCAM around 50%). Cell suspension was then added to the upper chamber as described.

BBB-EC dynamic flow adhesion system

Flow system adhesion assay was performed as previously published (Ifergan et al., 2011). Human BBB-ECs (2×10^5 cells/slide) were cultured on a μ -slideTM of 0.4 mm (Ibidi Integrated BioDiagnostics) in EC media in a final volume of 200 μ l for 4 days to reach

confluency. After 4 days, the μ -slide was washed with fresh media and placed inside a live chamber (Live Chamber 37°C and 5% CO₂). The μ -slide was connected to the flow system with a 50 cm long perfusion set tubing (aperture diameter of 0.8 mm) with a 90° angled connector. The flow generated by the Ibidi pump system was controlled via the Ibidi pump control software (Ibidi Integrated BioDiagnostics). For inflamed condition, ECs were pre-treated for 24h with TNF/IFN- γ 100U/ml. BBB-ECs (inflamed or resting) were then treated with the isotype control (20 μ g/ml) or anti-MCAM Ab (P1H12, 20 μ g/ml) 1 h prior to the addition of TH17 lymphocytes in a volume of 4 ml with a constant flow (applied air pressure: -3.7 mbar, flow rate: 0.43 ml/min, shear stress: 0.56 dyn/cm², shear rate: 27 γ /sec, cycle duration: 120 sec, unidirectional flow). CFSE-labeled *in vitro* cultured TH17 lymphocytes (5 X 10⁶) pretreated for 1 h (20 μ g/10⁶ cells, P1H12 or isotype as indicated) at 4°C were then added to the flow system for a final volume of 5 ml. The cell velocity was evaluated using a Hamamatsu ORCA-ER digital camera combined with the Improvion Volocity software v5.5. Live time-lapse acquisition videos were recorded at constant intervals during 30 minutes. Cell velocity was automatically quantified and analyzed from videos taken using different algorithms in Volocity software, removing clump cells and small debris based on their size and their basal fluorescence.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using PRISM Graphpad™ software and included ANOVA followed by Students' *t*-test or Bonferroni's post-test, depending on the number of comparisons to controls. Only *p* values < 0.05 were considered statistically significant. Data are expressed as mean \pm standard error of the mean.

Results

MCAM is expressed by human BBB-ECs and is up-regulated in inflammatory conditions.

MCAM was identified in a proteomic screen analysis of lipid raft membrane microdomains obtained from human BBB-ECs grown in primary culture (Cayrol et al., 2008; Wosik et al., 2007). We confirmed expression of MCAM in human brain ECs by PCR, Western blot, flow cytometry and immunocytofluorescence analysis (Fig. 1 A-D) and *in situ* in the healthy human and mouse CNS (Fig. 1E and supplementary Fig. 3A). We also found that treatment with TNF/IFN- γ increases MCAM expression by BBB-ECs (Fig. 1 C and D), as occurs with ICAM-1 or VCAM. These data demonstrate that MCAM is expressed by brain ECs and is up-regulated *in vitro* with inflammatory cytokine treatment.

MCAM defines a unique subset of circulating human T lymphocytes expressing IL-23R, ROR- γ , IL-17, GM-CSF and Granzyme B, in addition to IFN- γ and T-bet.

Since MCAM is known to interact with itself, we then sought to investigate the expression of MCAM on peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) obtained from human healthy donors. As shown in Figure 1F, MCAM expression is almost exclusively restricted to the CD4⁺ T lymphocyte population and MCAM is expressed on the surface of 2-5% of *ex vivo* human CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes. In particular, MCAM is found on the surface of a population of memory CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes (3-6% of CD3⁺CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes are MCAM⁺). Flow cytometry analysis of *ex vivo* CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes indicated that the expression of MCAM is associated with expression of CCR6, HLA-DR, CD95, CD147, CD25, CD69, CD107a and CD161 but not of CD28 (Supplementary Fig. 1A). Conversely, expression of CD6, CD62L, CD27 and CCR7 is less frequent in the MCAM⁺ population as compared to the MCAM^{neg} population (Supplementary Fig. 1A). Finally, while MCAM is also expressed by a small percentage of CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes *ex vivo* (Fig. 1F), it is barely detectable on the surface of *ex vivo* CD19⁺ B lymphocytes and CD14⁺ monocytes (Fig. 1F), or on *in vitro* differentiated mature dendritic cells and macrophages (Supplementary Fig. 1B). Longitudinal analysis (*ex vivo*) of CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes obtained from HC ($n = 4$) demonstrated stable expression of MCAM, with a maximal individual variation of 1.3% over two years (Fig. 1G). To further characterize the

population of circulating MCAM-expressing T lymphocytes, we sorted *ex vivo* CD4⁺CD45RO⁺MCAM⁺ and CD4⁺CD45RO⁺MCAM^{neg} lymphocytes from the PB of healthy donors and analyzed the expression of key transcription factors and cytokines. We demonstrated by qPCR analysis that MCAM⁺ lymphocytes express significantly more *IL-23Receptor (R)*, *ROR-γ* and *IL-17A* mRNA, but similar levels of *T-bet*, *GATA-3* and *IFN-γ* mRNA than MCAM^{neg} lymphocytes (Supplementary Fig. 1C). This was confirmed by immunocytofluorescence stainings of PB cells *ex vivo* (Supplementary Fig. 1D). As the CCR6⁺ CD161⁺ CD4⁺CD45RO⁺ lymphocyte subset contains the majority of human TH17 precursors (Cosmi et al., 2008), we further sought to address whether cell surface expression of MCAM would allow refining the identification or isolation of cells expressing TH17-related cytokines and associated transcription factors in this subset. *Ex vivo* CCR6⁺CD161⁺MCAM⁺ and CCR6⁺CD161⁺MCAM^{neg} CD4⁺CD45RO⁺ lymphocytes were sorted and analyzed by qPCR. We found that CCR6⁺CD161⁺MCAM⁺ lymphocytes express significantly more *IL-17A*, *IL-22*, *GM-CSF* and *ROR-γ* as compared to CCR6⁺CD161⁺MCAM^{neg} lymphocytes. Levels of *IL-23R* mRNA were also found to be increased in CCR6⁺CD161⁺MCAM⁺ lymphocytes, although not significantly (p = 0.08) and levels of *T-bet* and *IFN-γ* mRNA were similar in both populations (Fig 1H). Moreover, within the CCR6^{neg}CD161^{neg} lymphocyte population, the MCAM⁺ fraction expresses significantly more *ROR-γ* (12.5 fold increase, p = 0.01) and similar levels of *T-bet* (2.3 fold increase, p = 0.11) than MCAM^{neg} lymphocytes, while *IL-17* mRNA levels were below the detection limit in both populations. Taken together, these results demonstrate that cell surface expression of MCAM defines a subset of circulating human CD4⁺ T lymphocytes enriched in GM-CSF, IL-23R and in TH17-related cytokines and transcription factors.

MCAM+ lymphocytes produce higher levels of IL-17, IL-22, GM-CSF and granzyme B in response to IL-23 than their MCAMneg counterpart.

To evaluate whether MCAM expression is modulated upon activation and cytokine stimulation, we performed polyclonal activation of MCAMneg CD4+CD45RO+ T lymphocytes in the presence of various cytokines. IL-23 induces a stronger cell surface expression of MCAM (by flow cytometry) than all other tested cytokines (Fig. 2A). IL-2, IL-12, IL-17, GM-CSF, TNF and IFN- γ do not increase expression of MCAM above levels obtained with non-specific activation. The induction of MCAM following stimulation with IL-1 β , used alone or in combination with TNF, shows a trend toward an increased MCAM expression, albeit not significant ($p = 0.16$).

In longitudinal kinetic analyses of MCAM expression, IL-23-driven TH17 polarization induces MCAM expression on $47.6\% \pm 5.9\%$ of CD4+CD45RO+ T lymphocytes after 6 days in culture (Fig. 2B). In comparison, IL-12-driven TH1 or IL-4-driven TH2 polarization result in significantly lower percentages of cells expressing MCAM (Table 1). Moreover, the percentage of MCAM is significantly higher among double positive IFN- γ +/IL-17+ lymphocytes and single positive IL-17+ lymphocytes, as compared to single positive IFN- γ + or single positive IL-4+ (Table 1). Finally and interestingly, *ex vivo*-sorted CCR6+CD161+MCAM+ lymphocytes retain surface expression of MCAM after 6 days in culture under TH17-polarizing conditions, but down-regulate CCR6 and CD161 expression (Fig 2C).

During IL-23-driven polarization, we found the expression of IFN- γ to be comparable between MCAM+ and MCAMneg subpopulations (Fig. 2D), whereas the percentage of IL-17-expressing cells is significantly and consistently higher in MCAM+ CD4+ T lymphocytes than in MCAMneg cells (Fig. 2E). We further demonstrated that *IL-17A* and *ROR- γ* mRNA levels are preferentially up-regulated in MCAM+ lymphocytes following CD4+CD45RO+ *in vitro* activation (Fig. 2F). We next elected to study whether the expression of MCAM on the surface of activated human memory CD4+ T lymphocytes correlated with expression of other cytokines. While MCAM is found to be strongly associated with IL-17 expression, it is also associated with expression of GzB, IL-22 and GM-CSF (Fig. 2G and Supplementary Fig. 1E). In addition, lymphocytes co-expressing IL-17 and either IFN- γ , GM-CSF, IL-22 or GzB, as well as co-expressing IL-17, IFN- γ and GM-CSF, are significantly more frequent among the

MCAM⁺ fraction (Supplementary Fig. 1E). Conversely, levels of IL-4, IL-2 and IFN- γ are comparable between MCAM⁺ and MCAM^{neg} populations (Fig. 2G and Supplementary Fig. 1E). Moreover, similar results were obtained following *in vitro* activation of cells sorted according to surface expression of MCAM within the CD161⁺CCR6⁺ population (Fig. 2H). To confirm that MCAM expression is associated with activated CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes, cell division was assessed. A significantly higher percentage of dividing cells is observed in MCAM⁺ than in MCAM^{neg} lymphocytes following activation (Supplementary Fig. 1F). Taken together, our data identify MCAM as a stable cell surface marker which defines a subset of ROR- γ -expressing and IL-23-responsive human memory CD4⁺ T lymphocytes, which have the capacity to proliferate and to express the pro-inflammatory cytokines IL-17, GM-CSF, GzB and IL-22, in addition to IFN- γ .

MCAM⁺ lymphocytes are found in high proportions in the PB, the CSF and in CNS lesions of MS patients.

Since MCAM-expressing T lymphocytes can produce IL-17 and GM-CSF, they may play a role in the pathogenesis of TH17-mediated neuroinflammatory diseases such as MS. We therefore compared the expression of MCAM on *ex vivo* PBMCs obtained from MS patients, healthy controls (HC) and subjects affected with other neurological diseases (OND). The percentage of CD4⁺ T lymphocytes expressing MCAM is significantly increased in patients with relapsing-remitting (RR) MS and in patients with clinically isolated syndrome (CIS) suggestive of MS, as compared to HC and OND (Fig. 3A). Moreover, the percentage of MCAM⁺CD4⁺ T lymphocytes is significantly higher during acute relapse as compared to RRMS or CIS in remission. Conversely, treatment of RRMS is associated with a trend toward a reduction in the percentage of MCAM-expressing CD4 T lymphocytes ($p = 0.14$; Fig. 3A). Interestingly, patients with benign RRMS had lower numbers of MCAM expressing cells. Primary progressive (PP) and secondary progressive (SP) MS patients show significantly higher percentages of MCAM⁺CD4⁺ T lymphocytes as compared to HC (Fig. 3A). In addition, MCAM⁺ CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes from untreated active RRMS patients express significantly more IL-17 (in percentage and in mean fluorescence intensity) than MCAM⁺ CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes from HC, both *ex vivo* and following *in vitro* activation under TH17 skewing conditions ($n \geq 5$ per group, Fig. 3B and C). Finally, we found that MCAM⁺ CD4⁺ memory T lymphocytes are significantly enriched in the CSF of MS

patients when compared to the PB of the same patients (Fig. 3D), or to the CSF or PB of OND subjects. Since CSF-restricted oligoclonal bands (OCB) are recognized as a surrogate marker of MS, we sought to establish whether MCAM expression correlates with the presence of OCB. The percentage of MCAM⁺ cells in PB CD4⁺ lymphocytes was found to be significantly higher among subjects with OCB, as compared to subjects without OCB (Fig. 3E).

To establish the histopathological relevance of MCAM-expressing T lymphocytes in MS, we studied MCAM expression in CNS lesions of MS patients. We found an important up-regulation of MCAM on the surface of infiltrated vessels in active MS lesions, as compared to vessels in normal-appearing white matter (NAWM) and controls (HC) (Fig. 3F and G). MCAM is also co-expressed by IL-17-producing cells and by CD4⁺ T lymphocytes in perivascular infiltrates in active MS lesions (Fig. 3H), as well as by CD3⁺ T lymphocytes (Supplementary Fig 2). As observed by flow cytometry analysis of *ex vivo* and *in vitro* activated cells, intensity of MCAM immunostaining is moderately higher in MCAM⁺ BBB-ECs than MCAM⁺ CD4⁺ T lymphocytes (Fig. 1C, 1F, 2G and 3H). Our data strongly suggest that MCAM⁺ CD4⁺ T lymphocytes play a role in the pathophysiology of MS and that MCAM may serve as a clinically relevant disease biomarker of MS.

MCAM⁺ T lymphocytes show a higher migration capacity and MCAM blockade restricts the adhesion and migration of TH17-polarized lymphocytes.

To confirm the encephalitogenic potential of MCAM⁺ CD4⁺ T lymphocytes, we sorted the MCAM⁺ and MCAM^{neg} fractions from human memory CD4 T lymphocytes cultured in TH17 condition *in vitro*. The IL-17 and IFN- γ expression in these lymphocyte populations are shown in Figure 4A. Using a modified Boyden chamber assay, we first demonstrated that MCAM⁺ lymphocytes migrate more efficiently across human BBB-ECs than their MCAM^{neg} lymphocyte counterparts (Fig. 4A). We then confirmed the importance of MCAM in the adhesion and transmigration of TH17-polarized lymphocytes using an anti-MCAM monoclonal antibody (α MCAM mAb). Treatment of ECs with α MCAM mAb significantly increases the mean velocity of lymphocytes over resting or inflamed BBB-ECs in a dynamic flow system (Fig. 4B). Furthermore, using a modified Boyden chamber assay, we demonstrated that α MCAM mAb significantly reduces BBB transmigration of MCAM⁺ lymphocytes, but not of MCAM^{neg} lymphocytes (Fig. 4C). Finally, we observed MCAM

enrichment at points of BBB-EC/lymphocyte interaction *in vitro*, in structures reminiscent of transmigratory cups (Fig. 4D). Collectively, these data demonstrate that MCAM⁺ IL-23-polarized (TH17) lymphocytes preferentially migrate across BBB-ECs and that MCAM blockade limits their interaction with BBB-ECs and their transmigration across the brain endothelium *in vitro*.

Fc-MCAM administration and depletion of MCAM⁺ CD4 lymphocytes limit the severity of EAE.

In order to establish the importance of MCAM in CNS inflammation *in vivo*, we first confirmed expression of MCAM on mouse CNS endothelium and on infiltrating lymphocytes in the CNS of myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)₃₅₋₅₅-induced EAE animals. In these animals, MCAM is significantly up-regulated on CNS vessels within NAWM and lesions, as well as on CD4⁺ T lymphocytes derived from spleen/lymph node (LN) and CNS (Supplementary Fig. 3A and B), as compared to non-immunized control mice in which MCAM expression is barely detectable on lymphocytes. Moreover, expression of MCAM, as assessed by immunohistofluorescence stainings, is detected on IL-17-expressing CNS-infiltrating lymphocytes in EAE (Fig. 5A). We also confirmed that IL-23 induces a strong up-regulation of MCAM and of MCAM/IL-7R on MOG₃₅₋₅₅-reactivated murine lymphocytes (Supplementary Fig. 3C and D). Finally, the proportion of murine CD4⁺ T lymphocytes expressing IL-17 and GM-CSF following *in vitro* reactivation was significantly higher in the MCAM⁺ population than in the MCAM^{neg} population, while IFN- γ expression was similar (Supplementary Fig. 3E), matching our human observations.

Next, we elected to evaluate whether functional blockade of MCAM, using a chimeric human Fc-mouse MCAM fusion protein (Fc-MCAM), could impact on autoimmune neuroinflammation *in vivo*. Fc-MCAM injected intra-peritoneally (i.p.) to EAE-affected animals was found to bind to CNS microvessels (Supplementary Fig. 3F). Administration of Fc-MCAM prior to the development of EAE symptoms significantly delayed EAE onset and reduced clinical severity of EAE, as compared to control groups (PBS or isotype control; Fig. 5B). Moreover, Fc-MCAM treatment significantly reduced the number and the area of demyelinating and infiltrated lesions, in both the brain and spinal cord of animals (Fig. 5C and Supplementary Fig. 4). Fc-MCAM treatment also decreased the number of CD4, F4/80 or MHCII-expressing cells in the CNS of EAE mice sacrificed 15 days post-immunization (dpi)

(Fig. 5D and 5E). Although T lymphocyte activation in the peripheral compartment was not impaired in Fc-MCAM-treated animals (Fig. 5F), the percentage of lymphocytes expressing IL-17 was significantly lower in the CNS of Fc-MCAM-treated EAE-affected animals at 15 dpi as assessed by flow cytometry (Fig. 5G-H). Fc-MCAM treatment reduced the number of CD3⁺ lymphocytes infiltrating the CNS and expressing IL-17 (Fc-MCAM: 1.44 to 2.4×10^3 ; control: 1.2 to 2×10^4) and IFN- γ (Fc-MCAM: 1.2 to 2×10^4 ; control: 8 to 12×10^4). Fc-MCAM did not affect the absolute number of IL-17⁺ lymphocytes in draining LN of MOG-immunized animals (7 dpi; Fc-MCAM: $2.1 \times 10^5 \pm 18 \times 10^3$ IL-17⁺ lymphocytes; control: $1.6 \times 10^5 \pm 9 \times 10^3$ IL-17⁺ lymphocytes, n = 4 animals/condition) and did not impact on cell proliferation *in vitro* (Supplementary Fig. 3G). Of clinical relevance, therapeutic administration of the Fc-MCAM after the onset of EAE (11 dpi) significantly improved the clinical course of the disease (Fig. 5I), as compared to isotype control-treated animals and

To confirm the encephalitogenic potential of MCAM-expressing CD4⁺ T cells, we performed transfer EAE. Naive animals received either MOG₃₅₋₅₅-reactivated murine CD4⁺ T lymphocytes (14.1% MCAM⁺; 18.6% CD44^{high}) or MCAM-depleted MOG₃₅₋₅₅-reactivated murine CD4⁺ T cells (4.2% MCAM⁺ ; 15.3% CD44^{high}). MCAM depletion resulted in a significantly delayed and milder EAE course (Fig. 5J). Moreover, absolute numbers of IL-17⁺ and IL-17⁺/IFN- γ ⁺ double-positive lymphocytes were similar in the spleen and LN, but significantly lower in the CNS of MCAM-depleted recipient animals, as compared to non-depleted recipient animals (10 days post-transfer; Fig. 5K and 5L). Altogether, these data demonstrate that MCAM is an important contributor to neuroinflammatory processes *in vivo* and that blockade of MCAM or depletion of MCAM⁺ T lymphocytes reduce both the clinical severity of EAE and the pathological determinants of disease by limiting infiltration of IL-17⁺ and IL-17⁺/IFN- γ ⁺ T lymphocytes into the CNS, without impacting on lymphocyte activation in the peripheral compartment.

Discussion

In this report, we describe the role and function of MCAM in neuroinflammatory reactions. In healthy subjects, MCAM is expressed by BBB-ECs and by a discrete subset of memory CD4⁺ T lymphocytes in response to IL-23 stimulation. MCAM expression by CD4⁺ memory lymphocytes and by the CCR6⁺CD161⁺ subset of CD4⁺ memory lymphocytes is associated with high levels of ROR- γ IL-17, IL-22, GzB and GM-CSF and a high frequency of IL-17, IFN- γ and GM-CSF co-expressing lymphocytes. MCAM⁺ lymphocytes migrate more efficiently than MCAM^{neg} cells, and are found in higher proportions in the blood and in the CNS of MS patients as compared to controls. Finally, our data demonstrate that blockade of MCAM or depletion of MCAM⁺ T lymphocytes reduce TH17 lymphocyte transmigration across BBB-ECs *in vitro* and dampen the clinical severity of EAE and infiltration of IL-17⁺ and IL-17⁺/IFN- γ + lymphocytes in the CNS of EAE animals, *in vivo*.

We report herein that human BBB-ECs in primary culture express MCAM, as previously reported for HUVECs (Bardin et al., 2009). We further establish a strong association between the expression of MCAM and that of several markers associated with the TH17 lineage including the surface markers CD161 and CCR6 (Cosmi et al., 2008; Dagur et al., 2011). Moreover, we demonstrate that MCAM expression on CD4⁺CD45RO⁺ lymphocytes as well as on the CCR6⁺CD161⁺CD4⁺ memory lymphocyte subset is stable and associated with expression of recognized markers of TH17 lymphocytes (Korn et al., 2009), in addition to IFN- γ and T-bet. These findings thus not only converge with recent publications supporting an association between MCAM and TH17 lymphocytes (Brucklacher-Waldert et al., 2009; Dagur et al., 2011) but identify MCAM as a novel stable surface marker that can refine IL-17⁺ cells identification, as MCAM⁺ cells are characterized by both IL-17 and IFN- γ expression, while the MCAM^{neg} lymphocytes preferentially produce IFN- γ . Finally, our study provides further evidence linking MCAM to MMP biology (Bu et al., 2006; Mills et al., 2002; Xie et al., 1997), by demonstrating MCAM preferential expression on CD147 (EMMPRIN)-expressing cells (Agrawal et al., 2011; Agrawal and Yong, 2011).

Recent fate-mapping studies of TH17 lymphocytes indicate that most IFN- γ -producing T lymphocytes present in EAE infiltrates are ex-TH17, suggesting that CD4⁺ T lymphocytes are more plastic than previously recognized (Hirota et al., 2011). While the exact role of IL-17

in MS and EAE is still unclear, IL-23 and its receptor are essential for CNS autoimmune inflammation (Langrish et al., 2005) and transfer of TH17 lymphocytes generated in the presence of IL-23 (as compared to TGF- β) results in a more severe EAE course (Ghoreschi et al., 2010). In humans, we have previously reported the induction of IFN- γ -expressing and GzB-expressing TH17 lymphocytes upon IL-23 stimulation and their preferential recruitment in MS brains (Kebir et al., 2009). More recently, IL-23, in part through ROR- γ , was shown to drive the production of GM-CSF, an essential factor for EAE induction (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011; Kroenke et al., 2010; Ponomarev et al., 2007). Our data demonstrate that IL-23 stimulation induces and increases MCAM expression on human CD4+CD45RO+ T lymphocytes, as well as co-expression of MCAM and IL-7R on murine lymphocytes, a survival factor previously associated with expression of IL-23R (McGeachy et al., 2009). In addition, we report that following IL-23 stimulation, MCAM-expressing CD4+ memory T lymphocytes express higher levels of IL-23R, IL-17, IL-22, ROR- γ GM-CSF and GzB than MCAMneg lymphocytes, even more so within the CCR6+CD161+ fraction. Furthermore, we provide strong evidence demonstrating that IL-17, IL-22, GzB and GM-CSF-co-expressing lymphocytes and IL-17, IFN- γ and GM-CSF-triple-positive lymphocytes can be identified and separated based on cell surface expression of MCAM. Not surprisingly, these MCAM+ lymphocytes activated in the presence of IL-23 migrate more efficiently across BBB-ECs than MCAMneg cells. Therefore, the surface marker MCAM defines the subset of circulating and highly inflammatory IL-23-responsive effector memory T lymphocytes that produce IL-17, IL-22, GzB and GM-CSF, in addition to IFN- γ .

TH17 lymphocytes are more abundant in the PB and CSF of MS patients and are linked with relapses in MS (Alexander et al., 2010; Babaloo et al., 2010; Brucklacher-Waldert et al., 2009; Durelli et al., 2009; Frisullo et al., 2008; Li et al., 2011; Matusevicius et al., 1999). IL-23 is also elevated in the PB of MS patients (Alexander et al., 2010; Krakauer et al., 2008; Li et al., 2011). In accordance with these data, we report a significantly higher proportion of MCAM-expressing CD4+ and CD4+CD45RO+ lymphocytes in the PB and CSF of MS patients, as compared to HC and OND subjects. Most strikingly, MCAM expression was higher in patients in acute relapse but lower in patients under treatment, suggesting an association of lymphocyte-expressed MCAM with the inflammatory phase of the disease. Moreover, we show that MCAM is also expressed at the level of the BBB in the healthy CNS,

and that MCAM is strongly up-regulated on BBB-ECs in active MS lesions. Furthermore, we provide strong evidence showing that MCAM is expressed by IL-17-producing lymphocytes in perivascular immune infiltrates of active MS and EAE lesions. Expression of MCAM was previously reported on leukocytes within synovial effusions from arthritis patients (Dagur et al., 2010) and on PBMCs from patients suffering Behcet's, sarcoidosis, Crohn's disease (Dagur et al., 2011) and psoriasis (Kamiyama et al., 2012). Our study provides novel evidence in the context of MS and EAE supporting a crucial role of MCAM in organ-targeted inflammatory processes.

MCAM has been implicated in melanoma cell invasiveness and migration across ECs (Bardin et al., 2009; Mills et al., 2002; Xie et al., 1997). In addition to being a cell surface marker for a highly inflammatory T lymphocyte subset, our study demonstrates that MCAM is an adhesion molecule involved in the migration of these lymphocytes to the CNS. First, we confirm that MCAM participates in the adhesion of human TH17 lymphocytes to primary cultures of human BBB-ECs (Brucklacher-Waldert et al., 2009). We further demonstrate that MCAM blockade restricts TH17 lymphocyte migration across BBB-ECs *in vitro* and reduces infiltration of IL-17-producing cells in the CNS of EAE animals *in vivo*. In addition, we show that Fc-MCAM provides therapeutic protection even when administered after the onset of EAE, suggesting that blocking the recruitment of encephalitogenic T lymphocytes after disease onset could be beneficial, at least in EAE, and possibly in MS. Although speculative, we postulate that the Fc-MCAM *in vivo* binds to EC-expressed MCAM or to any additional unidentified ligand of MCAM, as suggested by Bardin *et al.* (Bardin et al., 2009), and impact on the interaction of MCAM with its' ligand(s). Finally, we provide strong evidence that depletion of MCAM⁺ lymphocytes reduces the severity of EAE and the entry of IL-17⁺ and IL-17⁺/IFN- γ ⁺ lymphocytes in the CNS, confirming that MCAM expression identifies CD4⁺ T lymphocytes with a significant encephalitogenic potential.

MCAM shows both homotypic (Staquicini et al., 2008) and heterotypic interactions with a yet unknown ligand(s) (Bardin et al., 2009). Since both BBB-ECs and pro-inflammatory lymphocytes express MCAM, MCAM-MCAM and MCAM-heterotypic ligand interactions could be relevant for lymphocytes infiltration into the CNS, and would warrant further studies. Our data provide strong evidence that MCAM is implicated in IL-17⁺ and IL-17⁺/IFN- γ ⁺ T lymphocytes migration across BBB-ECs, regardless of the type of interaction

(homotypic, heterotypic or both). We cannot exclude the possibility that MCAM blockade reduces the severity of EAE by affecting other cell subsets in addition to TH17 lymphocytes, especially as a small subset of mature NK cells also expresses MCAM in mice (Despoix et al., 2008). However, the presence of IL-17-producing CD4⁺MCAM⁺ T lymphocytes in immune cell infiltrates of EAE animals, as well as the significant reduction in the number of IL-17-producing cells in i) the CNS of MCAM-depleted CD4⁺ T lymphocytes recipient mice and in ii) the CNS of mice treated with Fc-MCAM blocker demonstrate that MCAM is an important molecular determinant of IL-17-expressing lymphocytes migration to the CNS *in vivo*. We postulate that the decreased number of CNS-infiltrating F4/80 macrophages, MHCII⁺ and the possible accumulation of IFN- γ -producing CD3⁺ T lymphocytes in peripheral lymphoid organs of Fc-MCAM-treated animals are consequences of the reduced accumulation in the CNS of IL-17- and IL-22-secreting cells, as these cytokines were previously shown to modulate BBB permeability and immune cell recruitment to the CNS (Kebir et al., 2007).

Overall, our data demonstrate that MCAM is expressed by CNS endothelial cells and represents a marker of peripheral effector memory T lymphocytes that have the potential to secrete IL-17, IL-22, GzB and GM-CSF, in addition to IFN- γ in response to IL-23 activation. MCAM is, to our knowledge, the first adhesion molecule involved in leukocyte homing and diapedesis whose expression is associated with a specific pro-inflammatory T lymphocyte subset. In that regard, as this adhesion molecule is specifically expressed by a lymphocyte subset with encephalitogenic capacity, blocking MCAM, or removing MCAM⁺ cells from the circulation, could provide therapeutic benefit without causing CNS immunosuppression, such as seen with VLA-4 blockers. Moreover, MCAM presents the advantage of being a reliable and stable surface marker of circulating IL-17⁺ and IL-17⁺/IFN- γ ⁺ lymphocytes, a potential biomarker of MS disease and a novel therapeutic strategy to efficiently target the highly inflammatory subset of memory T lymphocytes, by either depleting them in the periphery or by restricting their entry into target organs, such as the CNS.

Acknowledgments

This study was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP89885) and the Multiple Sclerosis Society of Canada (MSSC). C.L., L.H., S.G, E.V., I.I. hold scholarships and fellowships from the MSSC. R.C., J.I.A and H.K. hold scholarships and fellowships from the CIHR. N.A. holds a New Investigator Award from the CIHR. A.P. holds a Senior Scholar Award of the Fonds de Recherche du Québec-Santé.

Table and figures

	T _H 1 (IL-12-driven)	T _H 2 (IL-4-driven)	T _H 17 (IL-23-driven)
Total CD4 ⁺ CD45RO ⁺	100.0	100.0	100.0
<i>% of MCAM⁺ in this subset</i>	35.5±1.4 *	18.4±0.9 *	47.6±5.9
IL-17 ⁺ single positive (%)	6.1±0.4	8.4±1.5	13.4±2.1
<i>% of MCAM⁺ in this subset</i>	63.7±7.6 †	31.5±3.5 †	68.4±6.1
IFN-γ ⁺ single positive (%)	41.0±7.3	27.5±10.3	30.3±7.4
<i>% of MCAM⁺ in this subset</i>	39.3±6.9 †§	14.0±2.0 †§	48.1±9.6 †§
IL-17 ⁺ /IFN-γ ⁺ double positive (%)	5.5±0.8	3.7±0.8	8.7±2.4
<i>% of MCAM⁺ in this subset</i>	76.8±5.3	44.4±3.1	78.6±6.0
IL-4 ⁺ single positive (%)	7.4±1.2	14.5±4.0	6.2±2.8
<i>% of MCAM⁺ in this subset</i>	23.0±6.0 †§	7.9±2.4 †§	33.2±10.7 †§

CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes from 5 HC were cultured for 6 days *in vitro* in three different conditions: IL-12-driven polarization (T_H1), IL-4-driven polarization (T_H2) and IL-23-driven polarization (T_H17). Cells were then analyzed by flow cytometry for MCAM expression and cytokine expression.

* = p<0.05; % MCAM⁺ cells in T_H1 vs T_H17 culture condition or T_H2 vs T_H17 culture condition

† = p<0.05; % MCAM⁺ cells in IL-17⁺/IFN-γ⁺ double positive vs IFN-γ⁺ or IL-4⁺ or IL-17⁺ single positive, per culture condition

§ = p<0.05; % MCAM⁺ cells in IL-17⁺ single positive vs IFN-γ⁺ or IL-4⁺ single positive, per culture condition

Table 1: MCAM expression in TH1, TH2 and TH17 subsets.

Figure 1

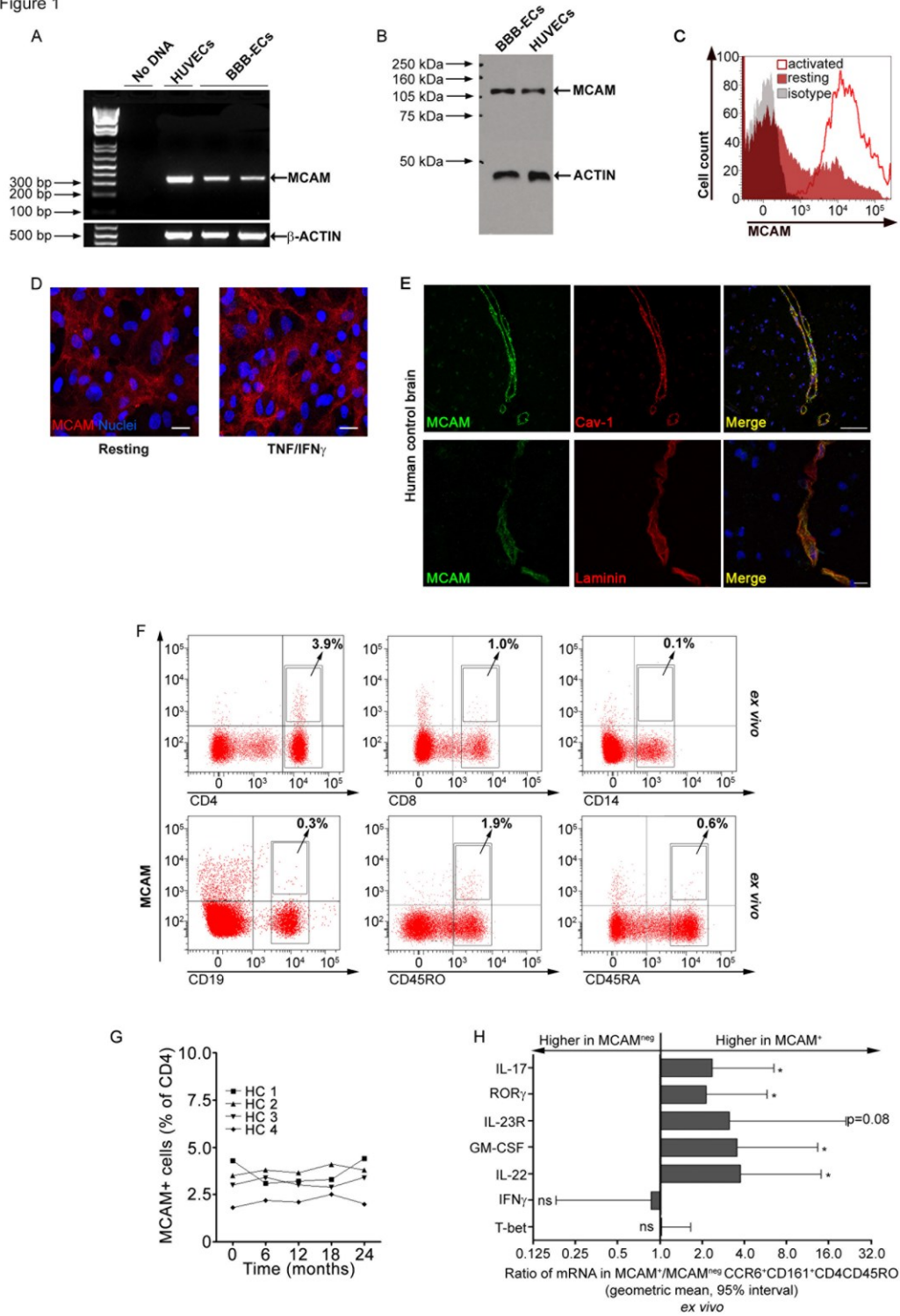


Figure 1: Expression of MCAM in primary cultures of human BBB-ECs and *ex vivo* PBMCs. (A) Expression of *MCAM* mRNA by PCR in HUVECs (positive control) and in two different preparations of human BBB-ECs, no DNA control in the first lane. Representative of $n = 5$ different preparations. (B) Expression of MCAM protein (105-115 kDa) in BBB-ECs assessed by Western blot, as compared to human umbilical vein ECs (HUVECs). Representative of $n = 5$ different preparations. (C, D) Expression of MCAM on the surface of BBB-ECs, under resting and inflammatory (TNF/IFN- γ , 100 U/ml) conditions. Representative of $n = 3$ independent experiments, as measured by flow cytometry (C) and by confocal microscopy (D), MCAM = red, nuclei = blue, scale bar = 10 μ m. (E) MCAM expression by BBB-ECs in CNS specimens obtained from human control donors. Co-stainings for MCAM (green) with Caveolin-1 (Cav-1, EC marker, red) and laminin (basal membrane marker, red). Scale bar upper panel = 75 μ m: lower panel = 10 μ m. Data shown are representative of 4 distinct control donors. Merged images are presented on the right panels and demonstrate co-localization (yellow) of MCAM with Cav-1 (upper row). MCAM staining is located on the abluminal side of laminin (lower row), which indicates that macro and microvascular ECs of the human CNS express MCAM. Nuclei were stained with TOPRO-3 (blue). (F) MCAM expression on *ex vivo* PBMCs obtained from healthy controls (HC). Representative dot plots of freshly isolated PBMCs from HC labeled with anti-MCAM antibody concurrently with cell specific markers, representative of $n = 12$ donors. (G) Time-course expression of MCAM by *ex vivo* CD4 T lymphocytes from individual HC collected at 6 months intervals for 2 years (0-24 months). $n = 4$ donors, 2 males and 2 females. (H) qPCR analysis of *IL-17*, *ROR- γ* , *IL-23R*, *GM-CSF*, *IL-22*, *IFN- γ* and *T-bet* mRNA expression in *ex vivo* CCR6+CD161+ CD4+CD45RO+ lymphocytes. Cells were sorted by FACS *ex vivo*, and separated according to expression of MCAM. Results are presented as ratios (MCAM+/MCAMneg) of mRNA transcripts expression, relative to *18S*. $n \geq 3$ donors.* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, ns = not significant.

Figure 2

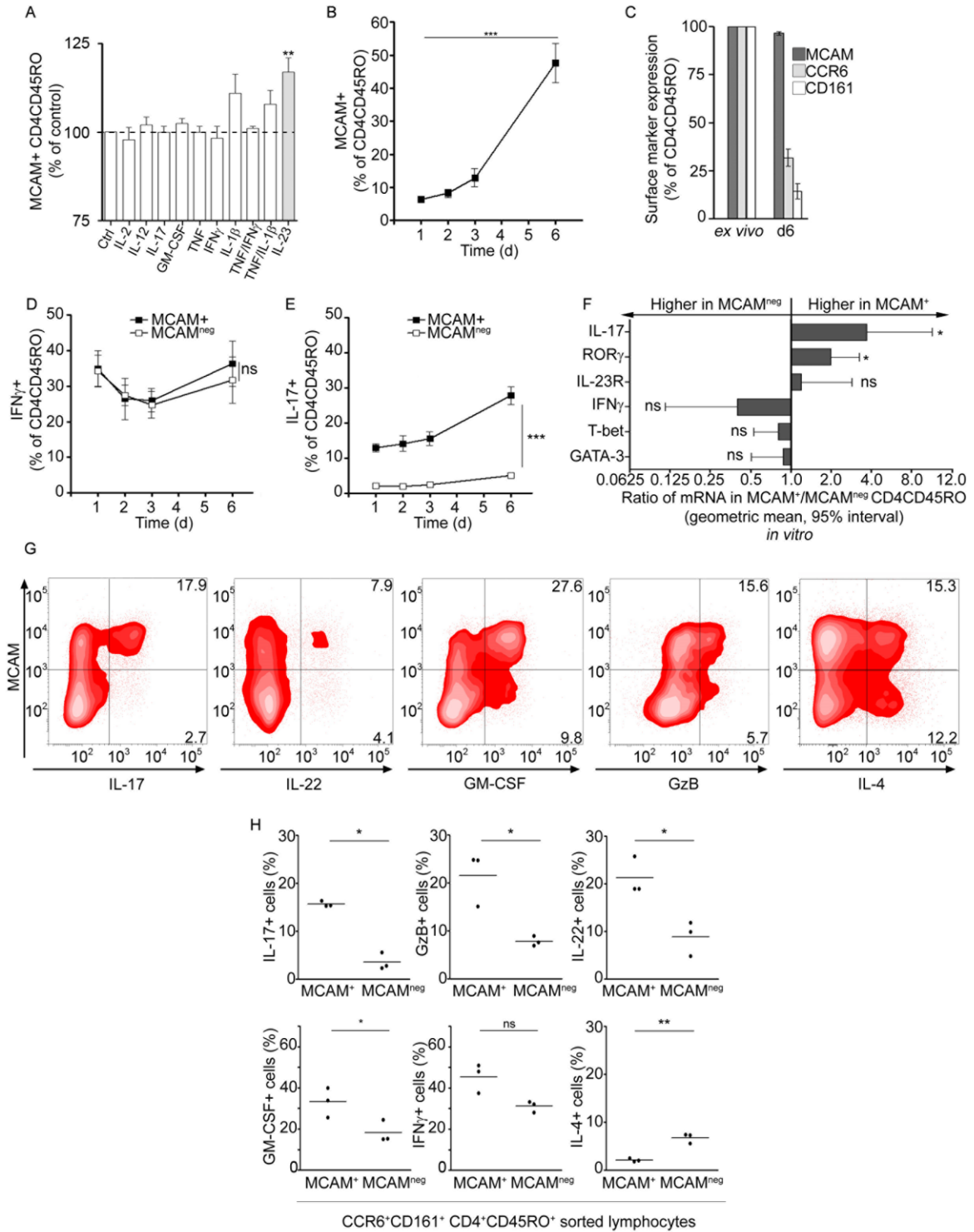


Figure 2: IL-23-driven polarization induces MCAM expression on human CD4+CD45RO+ T lymphocytes, and MCAM+ lymphocytes preferentially express IL-17, GzB, IL-22 and GM-CSF, in addition to IFN- γ . **(A)** IL-23 induces MCAM expression on human memory T lymphocytes. MCAMneg CD4+CD45RO+ T lymphocytes cultured for 6 days with anti-CD3/CD28 (Ctrl) in the presence of IL-2, IL-12, IL-17, GM-CSF, TNF, IFN- γ , IL-1 β , TNF/IFN- γ , TNF/IL-1 β or IL-23, as indicated. $n \geq 3$ donors, by flow cytometry. **(B)** Time-course expression of MCAM on CD4+CD45RO+ T lymphocytes during IL-23-driven polarization with autologous antigen-presenting cells (APCs) for 6 days. Total (unfractionated) CD4+CD45RO+ T lymphocytes were used. $n = 6$ donors, by flow cytometry. **(C)** Expression of CCR6, CD161 and MCAM on CCR6+CD161+MCAM+ CD4 memory lymphocytes sorted *ex vivo*. Cells were analyzed by flow cytometry *ex vivo* (left bars), and following IL-23-driven polarization for 6 days (right bars). $n = 3$ donors. **(D)** Time-course expression of IFN- γ and **(E)** of IL-17 by CD4+CD45RO+ T lymphocytes polarized *in vitro* with APCs and IL-23. Cytokine production was assessed at day 1, 2, 3 and 6 by flow cytometry, gating on MCAM+ and MCAMneg. $n = 6$ donors. **(F)** qPCR analysis of *IL-17A*, *ROR- γ IL-23R*, *IFN- γ* , *T-bet* and *GATA-3* mRNA by CD4+CD45RO+ T lymphocytes activated *in vitro* with APCs in the presence of IL-23. Following 6 days of activation, cells were sorted according to MCAM expression and were analyzed by qPCR; $n \geq 6$ donors. Results are presented as ratios (MCAM+/MCAMneg) of mRNA transcripts expression, relative to *18S*. **(G)** Expression of MCAM and IL-17, IL-22, GM-CSF, GzB and IL-4 on CD4+CD45RO+ T lymphocytes activated *in vitro* with APCs in the presence of IL-23. Data shown are representative dot plots obtained by flow cytometry. $n \geq 9$ donors. **(H)** Expression of IL-17, GzB, IL-22, GM-CSF, IFN- γ and IL-4 in CCR6+CD161+MCAM+ and CCR6+CD161+MCAMneg human CD4+ memory T lymphocytes sorted *ex vivo* and activated with anti-CD3/CD28 and IL-23 for 6 days. Cytokine production was assessed by flow cytometry. $n = 3$ donors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

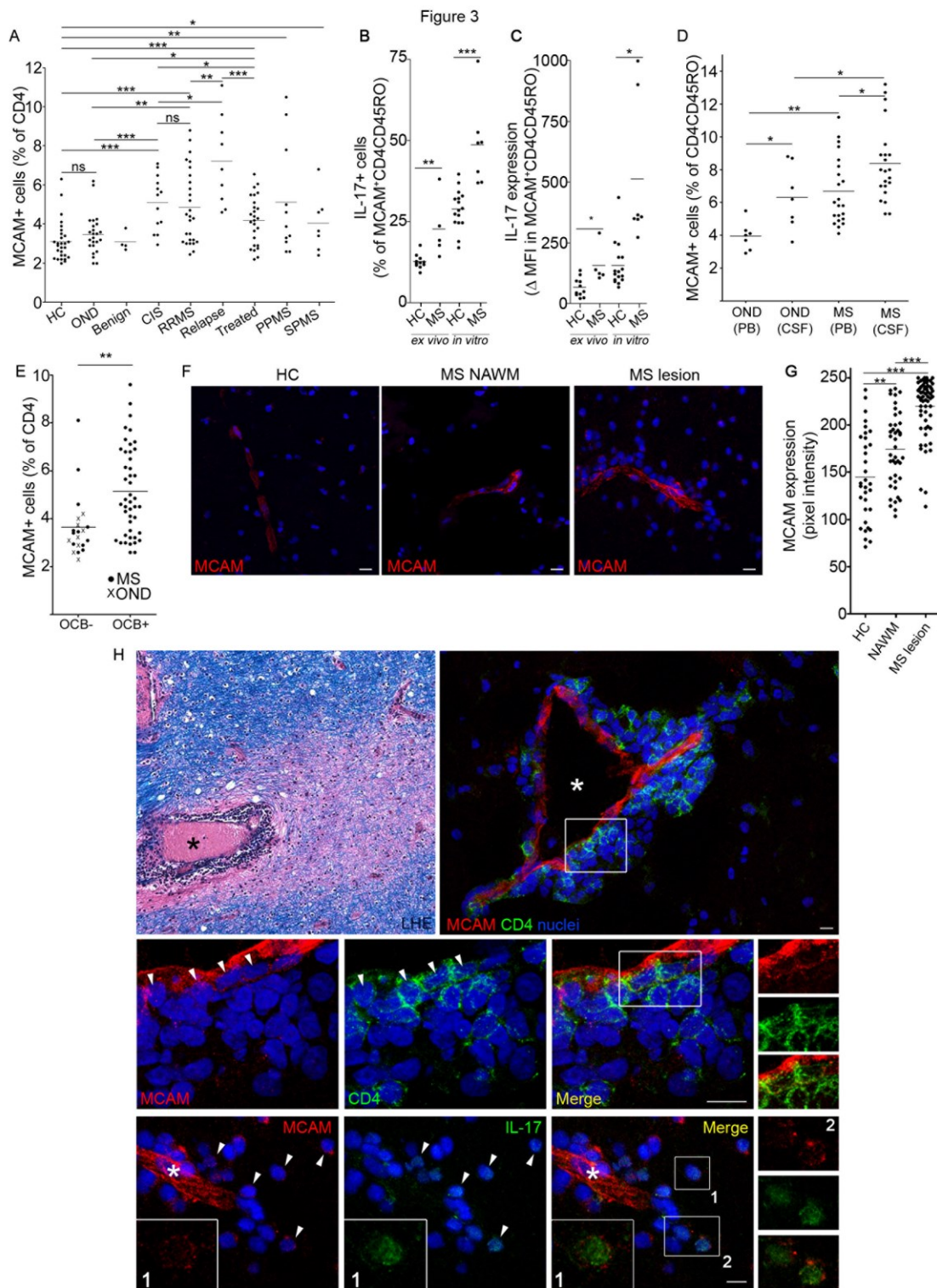


Figure 3: MCAM is up-regulated on PBMCs and in the CNS of MS-affected subjects. **(A)** MCAM expression by *ex vivo* peripheral blood (PB) CD4⁺ T lymphocytes of healthy controls (HC; *n* = 28), other neurological diseases (OND; *n* = 24), benign MS (benign; *n* = 4), clinically isolated syndrome suggestive of MS (CIS; *n* = 13), untreated relapsing-remitting (stable) MS patients (RRMS; *n* = 27), acutely relapsing RRMS (Relapse; *n* = 9), RRMS under treatment (Treated, *n* = 26), primary progressive MS (PPMS; *n* = 11) and secondary progressive MS (SPMS; *n* = 7). **(B)** IL-17 expression and **(C)** IL-17 mean fluorescence intensity (delta MFI over isotype) in *ex vivo* or *in vitro* activated MCAM⁺CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes from HC and untreated RRMS. Cells were analyzed by flow cytometry *ex vivo* or following activation for 6 days with autologous APCs and IL-23. *n* = 5 RRMS and 11 HC *ex vivo*; *n* = 7 RRMS and 16 HC *in vitro*. **(D)** MCAM expression by cerebrospinal fluid (CSF) CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes of MS patients (*n* = 22) and controls (OND) (*n* = 7), as compared to matched PB samples, *ex vivo*. **(E)** MCAM expression by PB CD4⁺ T lymphocytes from individuals with oligoclonal bands-positive CSF (OCB⁺, *n* = 45) and with OCB-negative CSF (OCB⁻, *n* = 21). MS (dot) and OND (x). For panels **(A-E)** all data were analyzed by flow cytometry. 1 dot = 1 donor. **(F and G)** MCAM expression *in situ* in human post-mortem CNS specimens from controls (HC), MS normal appearing white matter (MS NAWM) and MS lesions (scale bar = 10 μm). Representative of *n* = 3-4 donors. Quantification **(G)** was performed by pixel intensity analysis on ≥ 2 sections/patient, ≥ 10 vessels/section. MCAM expression in NAWM and MS lesion was analyzed in different areas from the same sections. **(H)** Expression of MCAM (red), IL-17 (green) and CD4 (green) in active MS lesions. Nuclei = blue. Asterisks identify blood vessels. Arrowheads identify MCAM and either CD4 or IL-17 co-localization. Representative of *n* = 3 MS patients, total of 10 lesions. Scale bar = 10 μm. Upper panel: Representative low power magnification images of Luxol Fast Blue/Hematoxylin and Eosin (LHE) staining (left) and of MCAM/CD4 expression (right) in active MS lesion. Middle panels: high power magnification images of MCAM/CD4 expression in the area labeled on the lesion (white square). Lower panels: high power magnification of MCAM/IL-17 expression by infiltrating cells. High power views of infiltrating cells are shown on right panels. Scale bars = 10 μm. ns = not significant, * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001. Additional images are available in supplementary figure.

Figure 4

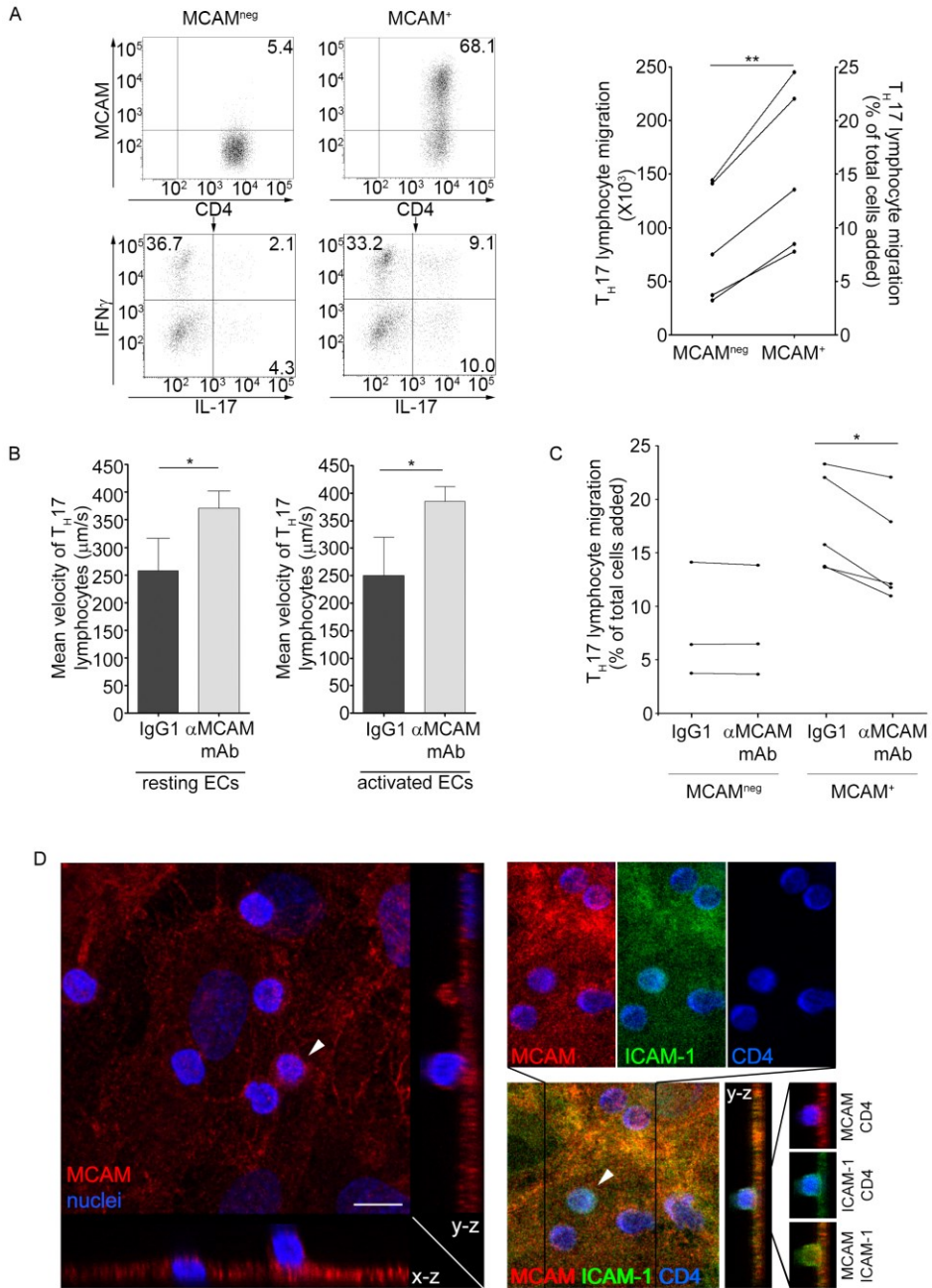


Figure 4: MCAM mediates IL-23-activated human memory lymphocyte adhesion and migration across BBB-ECs. **(A)** Representative flow cytometry dot plots of IL-17 and IFN- γ expression in MCAM⁺ or MCAM^{neg} cells sorted from CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes activated *in vitro* with APCs in the presence of IL-23, for 6 d (left panels). Migration of these MCAM⁺ or MCAM^{neg} CD4⁺CD45RO⁺ across human BBB-ECs in a modified Boyden chamber assay (right panel). $n = 5$ donors in 3 independent experiments. 1×10^6 lymphocytes were added to the upper chamber and allowed to migrate for 18h. Cells recovered from the lower chamber are shown as absolute numbers (left axis) and as percentage of total cells added to the upper chamber (right axis). **(B)** Velocity of human memory lymphocytes over resting (left) or activated (right) human BBB-ECs, using a dynamic flow assay. Human CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes were activated *in vitro* with APCs in the presence of IL-23. BBB-ECs and lymphocytes were treated with α -MCAM mAb (P1H12) or isotype control mAb (IgG1). $n = 5$ experiments, $>10,000$ events/experiment. **(C)** Migration of human memory lymphocytes across BBB-ECs in a modified Boyden chamber assay. 1×10^6 MCAM⁺ and MCAM-depleted IL-23-driven CD4⁺CD45RO⁺ cells were allowed to migrate for 18h in the presence of either α -MCAM mAb (P1H12) or isotype control mAb (IgG1). $n = 3-5$ independent experiments. Migration expressed as percentage of total cells added in the upper chamber. **(D)** Expression of MCAM (red) on magnetically-sorted CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes (blue) adhering to human BBB-ECs. Co-staining for ICAM-1 (green) and CD4 (blue). X-Y-Z projections show MCAM and MCAM/ICAM-1 enrichment surrounding the CD4 lymphocyte in transmigratory cups. Representative of $n = 3$ experiments. Scale bar = 10 μm . * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$.

Figure 5

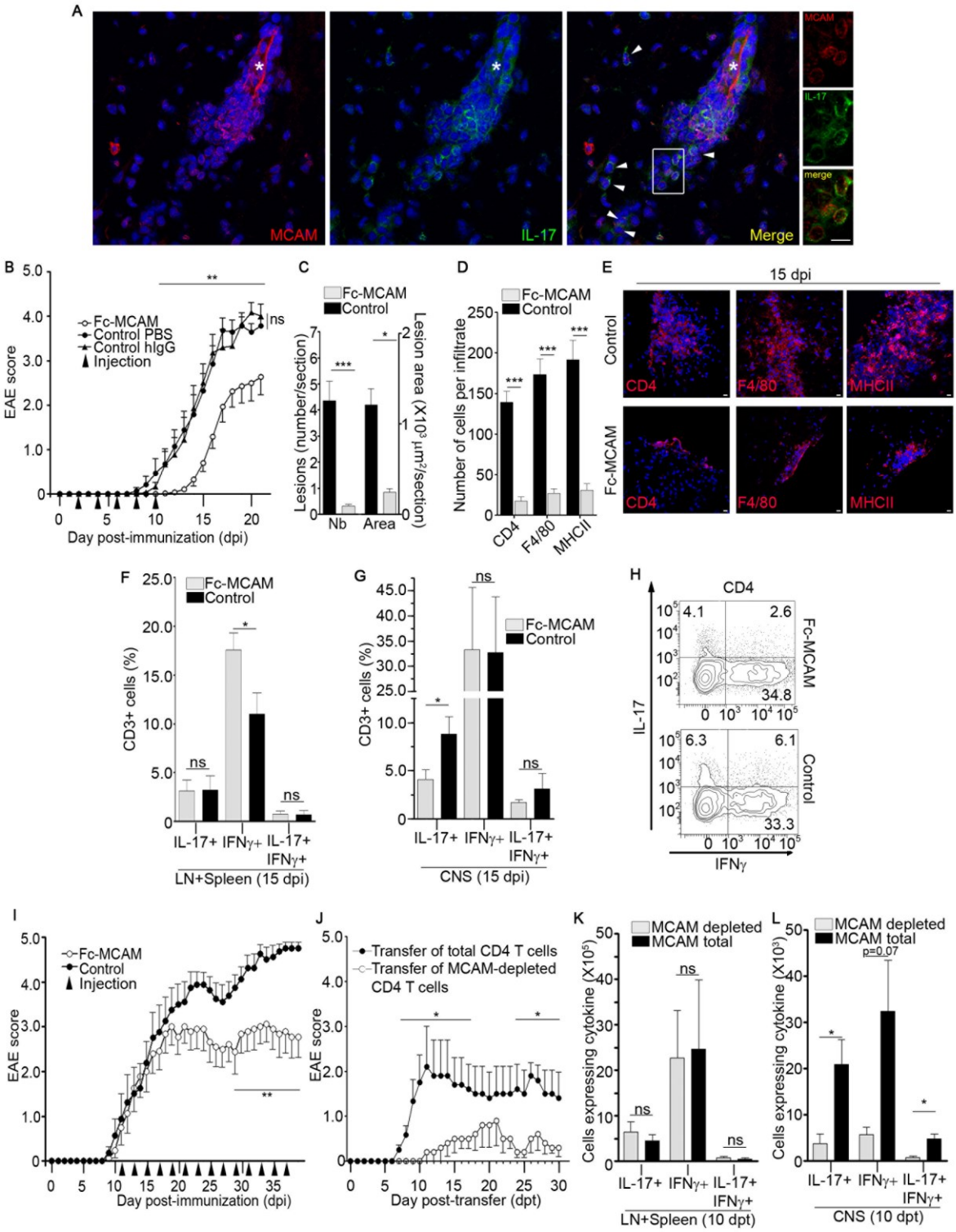
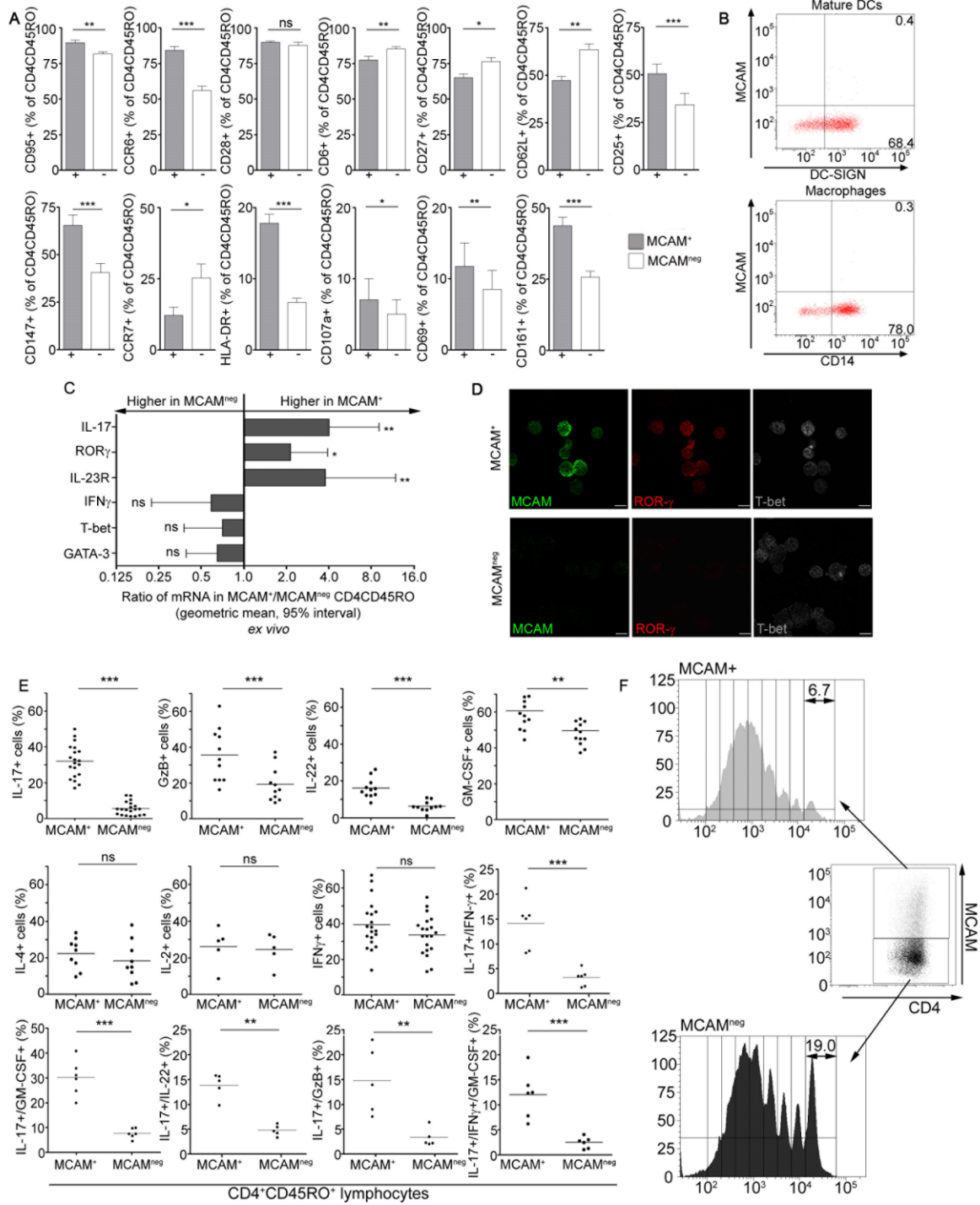


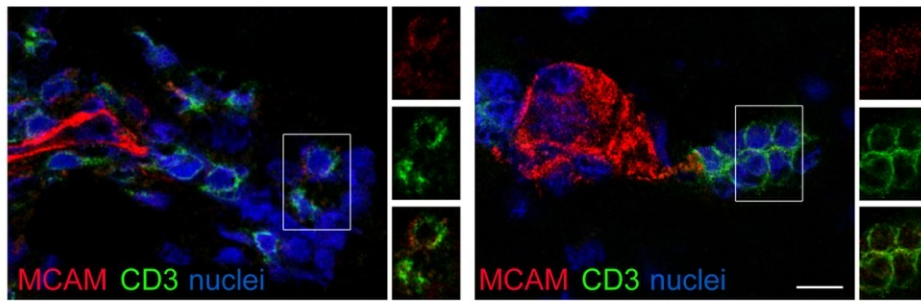
Figure 5: Administration of Fc-MCAM or depletion of MCAM⁺ lymphocytes limit the severity of MOG₃₅₋₅₅-induced EAE. **(A)** Expression of MCAM (red) and IL-17 (green) in CNS sections from MOG₃₅₋₅₅ immunized C57/BL6 animals. Nuclei = blue. Arrowheads denote MCAM⁺ IL-17⁺ cells. High power views of infiltrating cells are shown on right panels. Representative of *n* = 4 animals, 30 lesions studied. Scale bar = 10 μm. **(B)** Clinical course of EAE in MOG₃₅₋₅₅-immunized C57/BL6 animals treated with Fc-MCAM (200 μg i.p., open circles), vehicle (PBS, filled circles) or isotype control (hIgG; 200 μg i.p., filled triangles). Animals were injected before onset of symptoms at day 2, 4, 6, 8 and 10 post-immunization. Black arrowheads denote injection day. Representative of *n* = 3 independent EAE experiments, with *n* = 10 animals/group for each experiment. **(C)** Number and area of inflammatory lesions per CNS section in EAE animals treated with Fc-MCAM or control, at day 15 post-immunization (15 dpi). **(D)** Number of CD4⁻, F4/80⁻ and MHCII-expressing cells in spinal cord infiltrates of Fc-MCAM or control-treated EAE animals (15 dpi). **(E)** Representative immunostainings of CD4, F4/80 or MHCII (red) in CNS lesions of EAE animals (15 dpi) treated with Fc-MCAM or control. Blue = nuclei. Scale bar = 15 μm **(F)** IL-17 and IFN-γ expression by CD3⁺ T lymphocytes in lymph nodes (LN)/spleen and **(G)** in CNS (spinal cord and brain) of EAE animals (15 dpi) treated with Fc-MCAM or control, as assessed by flow cytometry. **(H)** Representative flow cytometry dot plots of IL-17 and IFN-γ expression by CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes isolated from the CNS of EAE animals treated with Fc-MCAM or control. **(I)** Clinical course of EAE in MOG₃₅₋₅₅-immunized C57/BL6 animals treated with Fc-MCAM (200 μg i.p., open circles), or control (filled circles) administered every other day (black arrowheads) after onset of symptoms (11 dpi). *n* = 8 animals per group. **(J)** Clinical course of EAE following adoptive transfer of MOG₃₅₋₅₅- reactivated TH17-polarized CD4⁺ T lymphocytes into naive C57/BL6 animals. Transfer of total (filled circles) or MCAM-depleted (open circles) CD4⁺ TH17 lymphocytes. *n* = 7 animals per group. **(K)** Absolute numbers of cells expressing IL-17 and IFN-γ in lymph nodes (LN)/spleen and **(L)** in the CNS of recipient animals following adoptive transfer of total CD4⁺ TH17 lymphocytes (*n* = 3, black bars) or MCAM-depleted CD4⁺ TH17 lymphocytes (*n* = 3, grey bars), as assessed by flow cytometry at day 10 post-transfer. Bar charts and time course shown are mean ± S.E.M. Panels c-i: *n* = 2-4 animals/condition and 4-32 sections per animal, in 2-3 independent experiments. ns = not significant, * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01, *** *p* < 0.001.

Supplementary Figure 1



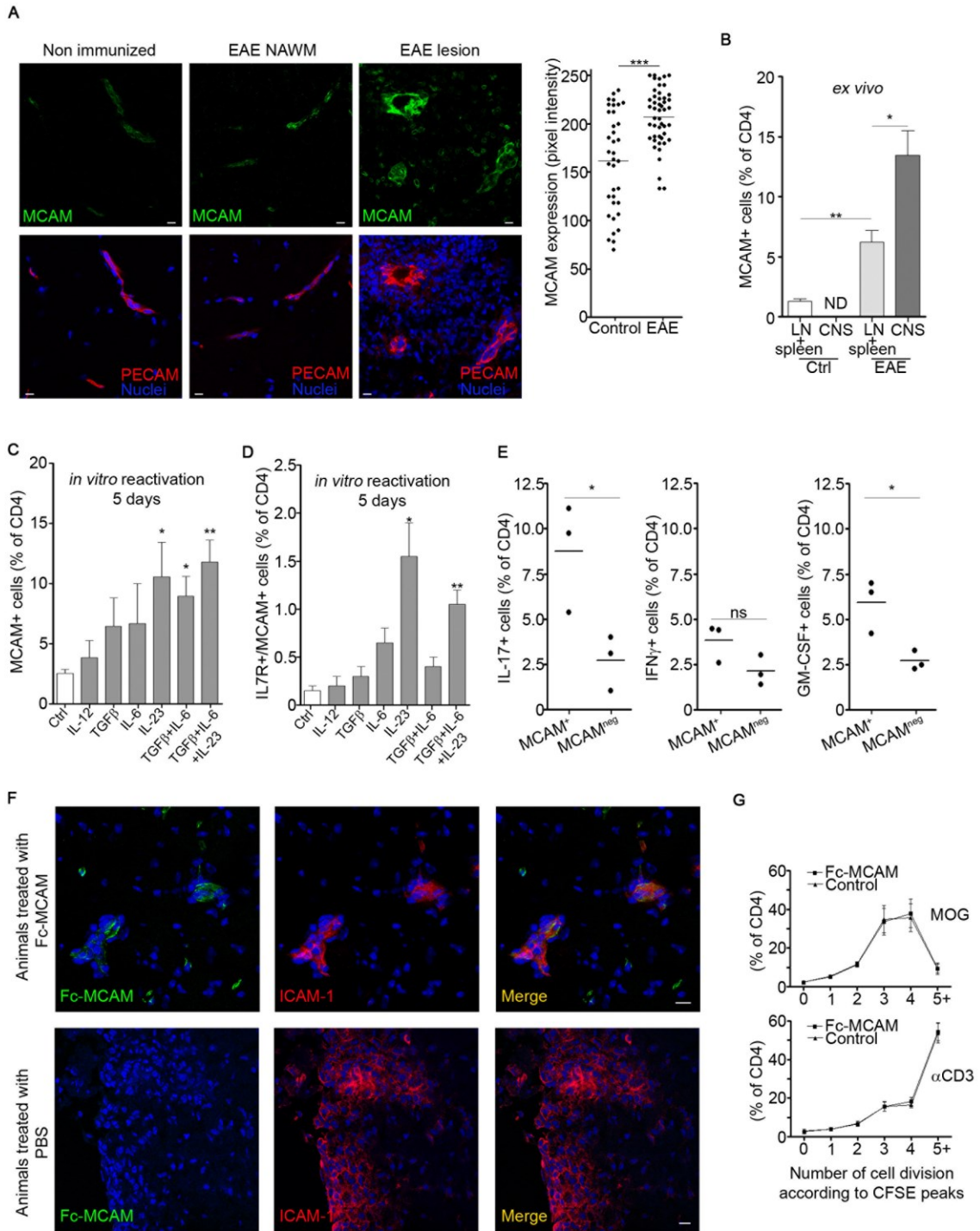
Supplementary Figure 1: MCAM⁺ CD4⁺CD4RO⁺ T lymphocytes represent a subset of human effector memory T lymphocytes co-expressing ROR- γ , IL-23R, IL-17, GM-CSF and GzB, in addition to IFN- γ . **(A)** Expression of CD95, CCR6, CD28, CD6, CD27, CD62L, CD25, CD147 (EMMPRIN), CCR7, HLA-DR, CD107a, CD69 and CD161 on MCAM⁺ (grey bars) and MCAM^{neg} (open bars) *ex vivo* CD4⁺CD4RO⁺ T lymphocytes, analyzed by flow cytometry. $n \geq 5$ donors for each marker. **(B)** MCAM expression on mature dendritic cells and monocyte-derived macrophages, representative flow cytometry dot plots of $n \geq 3$ donors. **(C)** qPCR analysis of *IL-17*, *ROR- γ* , *IL-23R*, *IFN- γ* , *T-bet* and *GATA-3* mRNA expression in FACS-sorted *ex vivo* MCAM⁺ and MCAM^{neg} CD4⁺CD45RO⁺ lymphocytes. Results are presented as ratios (MCAM⁺/MCAM^{neg}) of mRNA transcripts expression, relative to *18S*. $n \geq 6$ donors. **(D)** MCAM, ROR- γ and T-bet expression by immunocytofluorescence in *ex vivo* human CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes. Cells were sorted according to their MCAM status. Top panels: MCAM⁺ cells; Bottom panels: MCAM^{neg} cells. MCAM = green, ROR- γ = red and T-bet = grey. Representative of $n = 3$ donors. **(E)** Cytokine expression in MCAM⁺ and MCAM^{neg} human memory *in vitro* activated lymphocytes. Human CD4⁺CD45RO⁺ T lymphocytes were activated *in vitro* in the presence of autologous APCs and IL-23 for 6 days. Expression of IL-17, GzB, IL-22, GM-CSF, IL-4, IL-2, IFN- γ , co-expression of IL-17/IFN- γ , IL-17/GM-CSF, IL-17/IL-22, IL-17/GzB, and co-expression of IL-17/IFN- γ /GM-CSF was assessed by flow cytometry. $n \geq 5$ donors, 1 dot = 1 donor. **(F)** Proliferation of MCAM⁺ and MCAM^{neg} lymphocytes following polyclonal activation. Representative CFSE histogram of MCAM⁺ and MCAM^{neg} CD4⁺CD45RO⁺ lymphocytes at D6 post activation, $n \geq 8$. ns = not significant, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Supplementary Figure 2



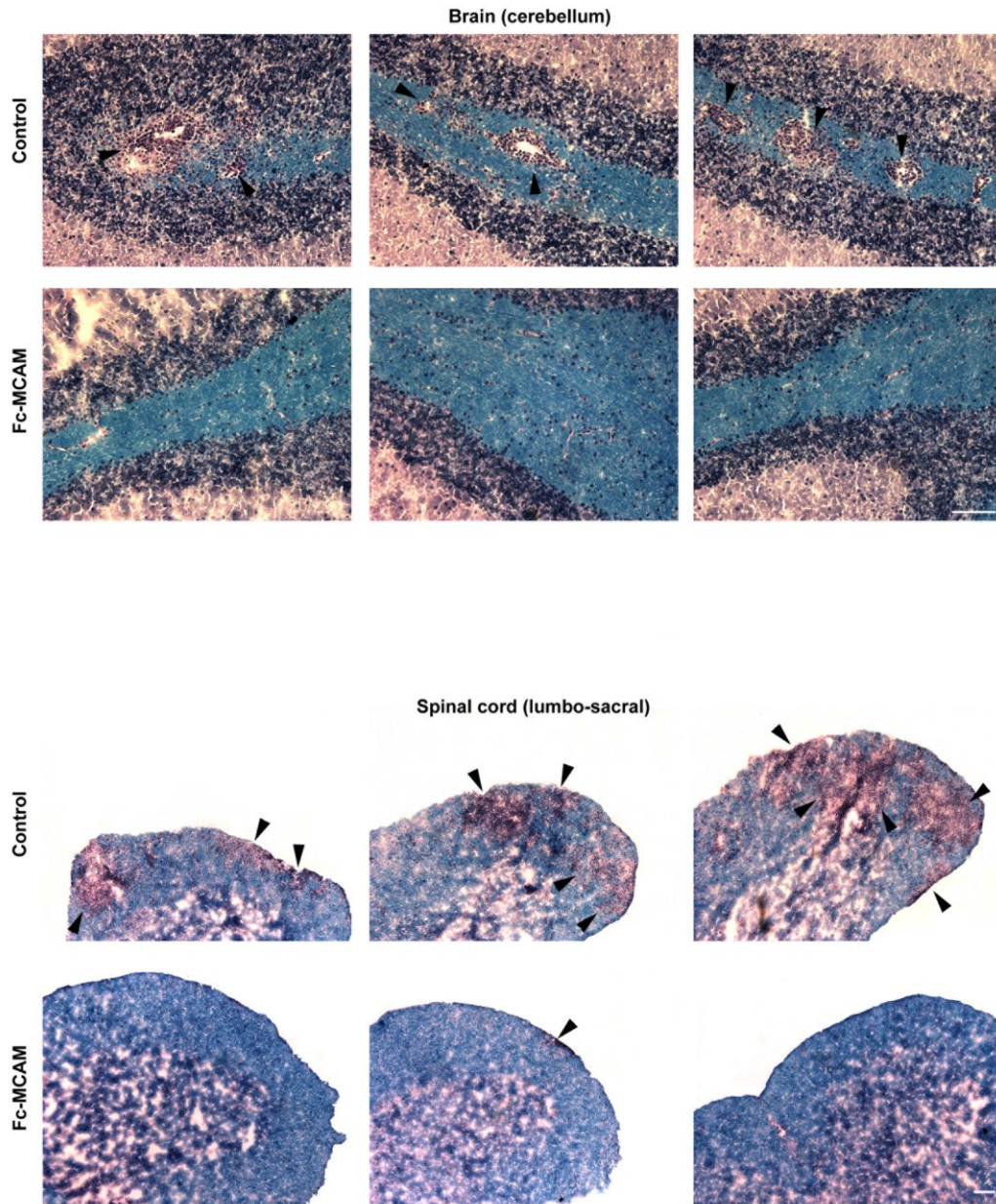
Supplementary Figure 2: Expression of MCAM (red) and CD3 (green) in active MS lesions. Nuclei = blue. Representative of $n = 3$ MS patients, total of 10 lesions. High power views of infiltrating cells are shown on right panels. Scale bar = 10 μm .

Supplementary Figure 3



Supplementary Figure 3: Expression of MCAM on CNS vessels and CD4 T lymphocytes of naive and EAE animals. (A) Representative immunohistofluorescence staining of MCAM (green) and PECAM (red) in the CNS of naive/non-immunized control and MOG₃₅₋₅₅-immunized EAE animals (EAE 'NAWM' and lesion) (left panel). Quantification of relative pixel intensity of MCAM on CNS vessels *in situ* in spinal cord sections from MOG₃₅₋₅₅-induced EAE C57BL/6 animals 15 days post-immunization (dpi) ($n = 4$) versus naive/non-immunized age-matched C57BL/6 mice (control; $n = 3$). ≥ 8 sections per animal. (B) Expression of MCAM on CD3+CD4+ T lymphocytes from spleen/lymph nodes (LNs) or from the CNS of MOG₃₅₋₅₅-induced EAE animals sacrificed 15 dpi, as compared to age-matched naive/non-immunized controls. MCAM expression was analyzed in 3 independent experiments by flow cytometry in $n \geq 3$ mice (pooled) for each condition. (C) Expression of MCAM and (D) co-expression of MCAM and IL7receptor (IL7R) by CD4+ T lymphocytes obtained from the spleen/LNs of MOG₃₅₋₅₅-immunized animals. Cells were analyzed following 5 days of *in vitro* reactivation with MOG₃₅₋₅₅ in the presence of anti-IFN- γ and either IL-12, TGF- β , IL-6, IL-23, TGF- β +IL-6 or TGF- β +IL-6+IL-23. MCAM expression on CD3+CD4+ lymphocytes was analyzed by flow cytometry. $n = 2$ experiments with pooled LNs/spleen leukocytes from ≥ 10 mice. (E) Expression of IL-17, IFN- γ and GM-CSF in MCAM-enriched or MCAM-depleted MOG₃₅₋₅₅-reactivated and IL-23 polarized CD4 T lymphocytes obtained from LNs/spleen of EAE animals. $n = 3$ experiments with pooled LNs and spleen leukocytes from ≥ 4 mice. (F) Immunostaining for Fc-MCAM (with goat anti-human IgG(Fc) Ab, green) and ICAM-1 (rat anti-mouse ICAM-1 Ab, red) in CNS sections from EAE animals treated with either Fc-MCAM (200 μ g/injection, top panels) or control (PBS, bottom panels). Data demonstrate that *in vivo* injections of Fc-MCAM result in binding of Fc-MCAM to cerebral microvessels. Nuclei = blue. $n = 2$ animals per group. Scale bar = 10 μ m. (G) Proliferation of CD4+ T lymphocytes *in vitro* in the presence of Fc-MCAM or control, as measured by flow cytometry using CFSE-labeled LN/spleenocytes from EAE animals. Cells were reactivated for 72h in the presence of MOG (upper panel) or anti-CD3 (lower panel) as indicated. $n = 2$ experiments with pooled LNs/spleen leukocytes from ≥ 3 mice. ns = not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Supplementary Figure 4



Supplementary Figure 4: Representative brain (top panels) and spinal cord (bottom panels) sections of MOG₃₅₋₅₅-immunized EAE animals stained with Luxol Fast Blue and H&E. Animals received prophylactic administration of Fc-MCAM (second and fourth rows) or control (first and third rows) on day 2, 4, 6, 8, 10 post-immunization. Representative images of 6 - 8 sections per animal, two animals per group, sacrificed 15 dpi. Arrowheads denote cell infiltrates. Scale bar = 100 μ m.

References

- Agrawal, S.M., C. Silva, W.W. Tourtellotte, and V.W. Yong. 2011. EMMPRIN: a novel regulator of leukocyte transmigration into the CNS in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci* 31:669-677.
- Agrawal, S.M., and V.W. Yong. 2011. The many faces of EMMPRIN - roles in neuroinflammation. *Biochim Biophys Acta* 1812:213-219.
- Alexander, J.S., M.K. Harris, S.R. Wells, G. Mills, K. Chalamidas, V.C. Ganta, J. McGee, M.H. Jennings, E. Gonzalez-Toledo, and A. Minagar. 2010. Alterations in serum MMP-8, MMP-9, IL-12p40 and IL-23 in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta1b. *Mult Scler* 16:801-809.
- Alvarez, J.I., and J.M. Teale. 2008. Multiple expression of matrix metalloproteinases in murine neurocysticercosis: Implications for leukocyte migration through multiple central nervous system barriers. *Brain Res* 1214:145-158.
- Awasthi, A., L. Riolo-Blanco, A. Jager, T. Korn, C. Pot, G. Galileos, E. Bettelli, V.K. Kuchroo, and M. Oukka. 2009. Cutting edge: IL-23 receptor gfp reporter mice reveal distinct populations of IL-17-producing cells. *J Immunol* 182:5904-5908.
- Babaloo, Z., F. Babaie, M. Farhoodi, M.R. Aliparasti, B. Baradaran, S. Almasi, and A. Hoseini. 2010. Interleukin-17A and Interleukin-17F mRNA Expression in Peripheral Blood Mononuclear Cells of Patients with Multiple Sclerosis. *Iran J Immunol* 7:202-209.
- Bardin, N., M. Blot-Chabaud, N. Despoix, A. Kebir, K. Harhour, J.P. Arsanto, L. Espinosa, P. Perrin, S. Robert, F. Vely, F. Sabatier, A. Le Bivic, G. Kaplanski, J. Sampol, and F. Dignat-George. 2009. CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* 29:746-753.

Bettelli, E., Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T.B. Strom, M. Oukka, H.L. Weiner, and V.K. Kuchroo. 2006. Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells. *Nature* 441:235-238.

Brucklacher-Waldert, V., K. Stuermer, M. Kolster, J. Wolthausen, and E. Tolosa. 2009. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* 132:3329-3341.

Bu, P., L. Gao, J. Zhuang, J. Feng, D. Yang, and X. Yan. 2006. Anti-CD146 monoclonal antibody AA98 inhibits angiogenesis via suppression of nuclear factor-kappaB activation. *Mol Cancer Ther* 5:2872-2878.

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

Codarri, L., G. Gyulveszi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, T. Suter, and B. Becher. 2011. ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12(6):560-567.

Cosmi, L., R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani, and F. Annunziato. 2008. Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor. *J Exp Med* 205:1903-1916.

Dagur, P.K., A. Biancotto, L. Wei, H. Nida Sen, M. Yao, W. Strober, R.B. Nussenblatt, and J. Philip McCoy, Jr. 2011. MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-

17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases. *J Autoimmun* 37(4): 36-47.

Dagur, P.K., G. Tatlici, M. Gourley, L. Samsel, N. Raghavachari, P. Liu, D. Liu, and J.P. McCoy, Jr. 2010. CD146+ T lymphocytes are increased in both the peripheral circulation and in the synovial effusions of patients with various musculoskeletal diseases and display pro-inflammatory gene profiles. *Cytometry B Clin Cytom* 78:88-95.

Despoix, N., T. Walzer, N. Jouve, M. Blot-Chabaud, N. Bardin, P. Paul, L. Lyonnet, E. Vivier, F. Dignat-George, and F. Vely. 2008. Mouse CD146/MCAM is a marker of natural killer cell maturation. *Eur J Immunol* 38:2855-2864.

Durelli, L., L. Conti, M. Clerico, D. Boselli, G. Contessa, P. Ripellino, B. Ferrero, P. Eid, and F. Novelli. 2009. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Ann Neurol* 65:499-509.

El-Behi, M., B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G.X. Zhang, B.N. Dittel, and A. Rostami. 2011. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12(6): 568-575.

Elshal, M.F., S.S. Khan, Y. Takahashi, M.A. Solomon, and J.P. McCoy, Jr. 2005. CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood. *Blood* 106:2923-2924.

Engelhardt, B. 2006. Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier. *J Neural Transm* 113:477-485.

Frisullo, G., V. Nociti, R. Iorio, A.K. Patanella, A. Marti, M. Caggiula, M. Mirabella, P.A. Tonali, and A.P. Batocchi. 2008. IL17 and IFN γ production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis. *Cytokine* 44:22-25.

Ghoreschi, K., A. Laurence, X.P. Yang, C.M. Tato, M.J. McGeachy, J.E. Konkel, H.L. Ramos, L. Wei, T.S. Davidson, N. Bouladoux, J.R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W.T. Watford, H.W. Sun, G. Eberl, E.M. Shevach, Y. Belkaid, D.J. Cua, W. Chen, and J.J. O'Shea. 2010. Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling. *Nature* 467:967-971.

Guezgues, B., P. Vigneron, N. Lamerant, C. Kieda, T. Jaffredo, and D. Dunon. 2007. Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor. *J Immunol* 179:6673-6685.

Hickey, W.F. 2001. Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system. *Glia* 36:118-124.

Hirota, K., J.H. Duarte, M. Veldhoen, E. Hornsby, Y. Li, D.J. Cua, H. Ahlfors, C. Wilhelm, M. Tolaini, U. Menzel, A. Garefalaki, A.J. Potocnik, and B. Stockinger. 2011. Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 12:255-263.

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

Ifergan, I., H. Kebir, S. Terouz, J.I. Alvarez, M.A. Lecuyer, S. Gendron, L. Bourbonniere, I.R. Dunay, A. Bouthillier, R. Moumdjian, A. Fontana, A. Haqqani, A. Klopstein, M. Prinz, R. Lopez-Vales, T. Birchler, and A. Prat. 2011. Role of Ninjurin-1 in the migration of myeloid cells to central nervous system inflammatory lesions. *Ann Neurol* 70:751-763.

Ifergan, I., K. Wosik, R. Cayrol, H. Kebir, C. Auger, M. Bernard, A. Bouthillier, R. Moumdjian, P. Duquette, and A. Prat. 2006. Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: relevance to multiple sclerosis. *Ann Neurol* 60:45-55.

- Kalyvas, A., and S. David. 2004. Cytosolic phospholipase A2 plays a key role in the pathogenesis of multiple sclerosis-like disease. *Neuron* 41:323-335.
- Kamiyama, T., H. Watanabe, M. Iijima, A. Miyazaki, and S. Iwamoto. 2012. Coexpression of CCR6 and CD146 (MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells. *J Dermatol* 39(10): 302-313.
- Kebir, H., I. Ifergan, J.I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette, and A. Prat. 2009. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 66:390-402.
- Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher, and A. Prat. 2007. Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13:1173-1175.
- Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka, and V.K. Kuchroo. 2009. IL-17 and Th17 Cells. *Annu Rev Immunol* 27:485-517.
- Krakauer, M., P. Sorensen, M. Khademi, T. Olsson, and F. Sellebjerg. 2008. Increased IL-10 mRNA and IL-23 mRNA expression in multiple sclerosis: interferon-beta treatment increases IL-10 mRNA expression while reducing IL-23 mRNA expression. *Mult Scler* 14:622-630.
- Kroenke, M.A., S.W. Chensue, and B.M. Segal. 2010. EAE mediated by a non-IFN-gamma/non-IL-17 pathway. *Eur J Immunol* 40:2340-2348.
- Langrish, C.L., Y. Chen, W.M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J.D. Sedgwick, T. McClanahan, R.A. Kastelein, and D.J. Cua. 2005. IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.
- Li, Y., H. Wang, Y. Long, Z. Lu, and X. Hu. 2011. Increased memory Th17 cells in patients with neuromyelitis optica and multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 234(1-2): 2011

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

Matusevicius, D., P. Kivisakk, B. He, N. Kostulas, V. Ozenci, S. Fredrikson, and H. Link. 1999. Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis. *Mult Scler* 5:101-104.

McGeachy, M.J., Y. Chen, C.M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W.M. Blumenschein, T.K. McClanahan, J.J. O'Shea, and D.J. Cua. 2009. The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo. *Nat Immunol* 10:314-324.

Mills, L., C. Tellez, S. Huang, C. Baker, M. McCarty, L. Green, J.M. Gudas, X. Feng, and M. Bar-Eli. 2002. Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma. *Cancer Res* 62:5106-5114.

Mrass, P., and W. Weninger. 2006. Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors. *Immunol Rev* 213:195-212.

Pittet, C.L., J. Newcombe, J.P. Antel, and N. Arbour. 2011. The majority of infiltrating CD8 T lymphocytes in multiple sclerosis lesions is insensitive to enhanced PD-L1 levels on CNS cells. *Glia* 59:841-856.

Polman, C.H., P.W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D.H. Miller, J.T. Phillips, F.D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M.A. Panzara, and A.W. Sandrock. 2006. A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354:899-910.

Polman, C.H., S.C. Reingold, G. Edan, M. Filippi, H.P. Hartung, L. Kappos, F.D. Lublin, L.M. Metz, H.F. McFarland, P.W. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A.J. Thompson, B.G.

Weinshenker, and J.S. Wolinsky. 2005. Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2005 revisions to the "McDonald Criteria". *Ann Neurol* 58:840-846.

Ponomarev, E.D., L.P. Shriver, K. Maresz, J. Pedras-Vasconcelos, D. Verthelyi, and B.N. Dittel. 2007. GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 178:39-48.

Ransohoff, R.M. 2005. Natalizumab and PML. *Nat Neurosci* 8:1275.

Sers, C., K. Kirsch, U. Rothbacher, G. Riethmuller, and J.P. Johnson. 1993. Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains. *Proc Natl Acad Sci U S A* 90:8514-8518.

Sospedra, M., and R. Martin. 2005. Immunology of multiple sclerosis. *Annu Rev Immunol* 23:683-747.

Staquicini, F.I., A. Tandle, S.K. Libutti, J. Sun, M. Zigler, M. Bar-Eli, F. Aliperti, E.C. Perez, J.E. Gershenwald, M. Mariano, R. Pasqualini, W. Arap, and J.D. Lopes. 2008. A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans. *Cancer Res* 68:8419-8428.

Stromnes, I.M., L.M. Cerretti, D. Liggitt, R.A. Harris, and J.M. Goverman. 2008. Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* 14:337-342.

Tzartos, J.S., M.A. Friese, M.J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M.M. Esiri, and L. Fugger. 2008. Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172:146-155.

Wosik, K., R. Cayrol, A. Dodelet-Devillers, F. Berthelet, M. Bernard, R. Moundjian, A. Bouthillier, T.L. Reudelhuber, and A. Prat. 2007. Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis. *J Neurosci* 27:9032-9042.

Xie, S., M. Luca, S. Huang, M. Gutman, R. Reich, J.P. Johnson, and M. Bar-Eli. 1997. Expression of MCAM/MUC18 by human melanoma cells leads to increased tumor growth and metastasis. *Cancer Res* 57:2295-2303.

Yang, Y., J. Weiner, Y. Liu, A.J. Smith, D.J. Huss, R. Winger, H. Peng, P.D. Cravens, M.K. Racke, and A.E. Lovett-Racke. 2009. T-bet is essential for encephalitogenicity of both Th1 and Th17 cells. *J Exp Med* 206:1549-1564.

Zhuang, J., T. Jiang, D. Lu, Y. Luo, C. Zheng, J. Feng, D. Yang, C. Chen, and X. Yan. 2010. NADPH oxidase 4 mediates reactive oxygen species induction of CD146 dimerization in VEGF signal transduction. *Free Radic Biol Med* 49:227-236.

Résultats: Manuscrit 2

Titre: Role of MCAM in CD8 T lymphocyte-mediated CNS inflammation.

Journal: soumission à venir

Auteurs : Catherine Larochelle, Marc-André Lécuyer, Jorge Ivan Alvarez, Marc Charabati, Olivia Saint-Laurent, Hania Kebir, Romain Cayrol, Lyne Bourbonnière, Simone Terouz, Sandra Larouche, Camille Pittet, Diane Beauseigle, Pierre Duquette, Nathalie Arbour & Alexandre Prat

Contributions : Le projet a été initié et élaboré par le Dr Alexandre Prat et moi-même. J'ai réalisé la majorité des expériences avec l'assistance de Lyne Bourbonnière et de Sandra Larouche et Marc Charabati. Marc-André Lécuyer a réalisé certaines expériences animales et va diriger les révisions du manuscrit. Olivia Saint-Laurent a caractérisé la colonie d'animaux TCR1640 et a participé aux expériences impliquant ces mêmes animaux. Dr Jorge Ivan Alvarez et Simone Terouz ont participé aux discussions scientifiques et ont fourni une partie des données *in situ*. Dr Hania Kebir a participé aux discussions scientifiques et à la révision du manuscrit. Dr Romain Cayrol avait initié le projet MCAM et caractérisé certains outils utilisés dans cet article. Dr Pierre Duquette a fourni la majorité des échantillons de sang et de LCR. Dr Nathalie Arbour, aidée de Diane Beauseigle, a réalisé les analyses par PCR et aidée de Dr Camille Pittet a réalisé certaines expériences *in vitro*, en plus de participer aux discussions scientifiques, à l'élaboration et l'analyse des expériences et à la révision du manuscrit. Toutes les étapes du projet ont été réalisées sous la supervision et la direction du Dr Alexandre Prat. Le manuscrit a été rédigé par le Dr Alexandre Prat et moi-même.

Role of MCAM in CD8 T lymphocyte-mediated CNS inflammation.

Catherine Larochelle^{1,2*}, Marc-André Lécuyer¹, Jorge Ivan Alvarez¹, Marc Charabati¹, Olivia Saint-Laurent¹, Hania Kebir¹, Romain Cayrol¹, Lyne Bourbonnière¹, Simone Terouz¹, Sandra Larouche¹, Camille Pittet¹, Diane Beauseigle¹, Pierre Duquette^{1,2,3}, Nathalie Arbour^{1,3}, Alexandre Prat^{1,2,3}

¹ Neuroimmunology Research Laboratory, Center of Excellence in Neuromics, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montréal, Québec, Canada.

² Multiple Sclerosis Clinic, Department of Neurology, CHUM-Notre-Dame Hospital, Montréal, Québec, Canada.

³ Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

Corresponding author:

A. Prat MD, PhD,

Running title: MCAM⁺CD8⁺ in neuroinflammation

Keywords: MCAM (CD146), multiple sclerosis (MS), CD8, Tc17, blood-brain barrier, EAE, leukocyte transmigration, cytotoxicity.

Abstract

The exact contribution of CD8⁺ T lymphocytes to central nervous system (CNS)-targeted inflammation remains a subject of debate. While the frequency of CD161⁺CD8⁺ T lymphocytes is increased in the peripheral blood (PB) of multiple sclerosis (MS)-affected patients, and while IL-17-producing CD8⁺ T cells are enriched in their CNS compartment and in animals with experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), limited information is available about the expression of specific adhesion molecules by Tc17 lymphocytes and about their role in neuroinflammation. Herein, we demonstrate that MCAM is an adhesion molecule expressed by human effector CD161⁺ and CCR6⁺ T lymphocytes and that MCAM expression on CD8⁺ T lymphocytes is strikingly up-regulated during MS acute relapses. We further demonstrate that MCAM⁺ CD8⁺ T lymphocytes express more IL-17, IFN- γ , GM-CSF and TNF than MCAM^{neg} lymphocytes, and that MCAM blockade reduces the transmigration of CD8⁺ T lymphocytes across human CNS-derived ECs *in vitro*. Moreover, MCAM⁺ CD8⁺ T lymphocytes express more CD107a and exhibit an enhanced killing capacity as compared to their MCAM negative counterpart. Finally, expression of MCAM is up-regulated on CD8⁺ T lymphocytes in the periphery and in the CNS of MOG-immunized and TCR transgenic EAE animals. Blocking or depleting MCAM *in vivo* result in milder chronic neurological deficits. Our data clearly demonstrate that MCAM identifies pro-inflammatory CD8⁺ T lymphocytes with high effector, migratory and killing capacity, and emphasize the notion that MCAM is a biomarker of MS disease activity and a valid target for the treatment neuroinflammatory conditions.

Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is an idiopathic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) characterized by multifocal infiltration of T lymphocytes across microvascular structures called the blood-brain barrier (BBB). The roles of CD4⁺ T lymphocytes have been extensively studied in the initiation and perpetuation of CNS lesions in MS and in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). TH1 (i.e. producing IFN- γ) and TH17 (i.e. producing IL-17, IL-22 and GM-CSF)-polarized CD4⁺ T lymphocytes have been identified as pathogenic effectors of disease in MS and EAE (Langrish, Chen et al. 2005, Kebir, Ifergan et al. 2009, Ghoreschi, Laurence et al. 2010, Codarri, Gyulveszi et al. 2011, El-Behi, Ciric et al. 2011). These encephalitogenic CD4⁺ T lymphocytes preferentially express the chemokine receptor CCR6 (Reboldi, Coisne et al. 2009), as well as melanoma cell adhesion molecule (MCAM/CD146), an adhesion molecule which contributes to the recruitment of TH17 from the peripheral blood (PB), across the blood-brain barrier (BBB) and into the CNS (Brucklacher-Waldert, Stuerner et al. 2009, Flanagan, Fitzgerald et al. 2012, Larochelle, Cayrol et al. 2012).

However, the exact contribution of CD8⁺ T lymphocytes, including Tc1 (i.e. producing IFN- γ) and Tc17 (i.e. producing IL-17) lymphocytes to neuroinflammation remains controversial. While IL-17-producing CD8⁺ T lymphocytes are markedly enriched in a subset of cells expressing CCR6 and CD161 (Maggi, Santarlasci et al. 2010), recent studies demonstrated that the frequency of CD161⁺ CD8⁺ T lymphocytes is increased in the PB and in CNS lesions of MS-affected patients as compared to controls (Annibaldi, Ristori et al. 2011, Abrahamsson, Angelini et al. 2013). Conversely, CD161^{high}CD8⁺ mucosal-associated invariable T cells are markedly decreased following intensive immunosuppressive therapies in MS (Abrahamsson, Angelini et al. 2013). Interestingly, IL-17-producing CD8⁺ T cells are enriched in the cerebrospinal fluid (CSF) (Huber, Heink et al. 2013) and in active lesions (Tzartos, Friese et al. 2008) of MS subjects, as well as in the CNS of animals with EAE (Ifergan, Kebir et al. 2011, Huber, Heink et al. 2013). Moreover, IL-17-production by CD8⁺ T lymphocytes was recently reported to play an important role for the development of TH17-mediated EAE (Huber, Heink et al. 2013). Overall, these data suggests a potential implication of Tc17 lymphocytes in the pathogenesis of MS. Identification of surface markers and

adhesion molecules specifically expressed by Tc17 lymphocytes could provide new therapeutic targets in MS and refine the characterization of this potentially pathogenic subset (Denic, Wootla et al. 2013).

In the current manuscript we demonstrate that expression of MCAM is strikingly up-regulated on circulating CD8⁺ T lymphocytes during MS relapses and is present on infiltrating CD8⁺ T lymphocytes in CNS lesions of MS patients. We provide an *ex vivo* and *in vitro* phenotypic characterization of human MCAM⁺ CD8⁺ T lymphocytes and demonstrate that these cells are effector CD161⁺ and CCR6⁺ T lymphocytes expressing high levels of IL-17, IFN- γ , GM-CSF and TNF, but significantly less IL-10, IL-4 and FoxP3 than MCAM^{neg} CD8⁺ T lymphocytes. Furthermore, anti-MCAM blocking Abs significantly reduces CD8⁺ T lymphocyte transmigration across human BBB-ECs *in vitro*. Finally, human MCAM⁺ CD8⁺ T lymphocytes have an enhanced capacity to kill human oligodendrocytes *in vitro*, as compared to MCAM^{neg} cells. *In vivo*, expression of MCAM is up-regulated on CD8⁺ T lymphocytes in MOG₃₅₋₅₅-immunized C57BL/6 mice, as well as in TCR transgenic SJL/J mice displaying spontaneous chronic progressive EAE. Depleting MCAM⁺ CD8⁺ T lymphocytes or blocking MCAM *in vivo* reduces chronic cumulative neurological deficits in both MOG-induced and TCR transgenic EAE. Our data demonstrate that IL-17-producing CD8⁺ T lymphocytes with enhanced effector and killing capacity use MCAM to cross the BBB and enter the CNS, and that MCAM could serve as a peripheral marker for MS disease activity and a target to impact on MS progression and long-term disability.

Material and methods

Patient classification

Patients were classified by 2 certified neurologists according to 2010 McDonald's revised criteria (Polman, Reingold et al. 2011) as relapsing-remitting MS (RRMS), primary progressive MS (PPMS), secondary progressive MS (SPMS), other non-inflammatory neurological disease (OND), or healthy control (HC). RRMS patients classification was further refined according to disease activity and treatment status as follows: untreated RRMS patients in remission (RRMS), untreated acutely relapsing RRMS (AR), remitting RRMS under treatment with beta interferon or glatiramer acetate (IFN β or GA), with fingolimod (FTY) or with dimethyl fumarate (BG-12). Acute relapse was defined as presence of new gadolinium-enhancing lesion(s) on MRI and/or acute onset of new neurological deficits lasting more than 48h and not attributable to another cause, within ≤ 3 weeks before sample was taken. OND consisted of migraine, leukoaraiosis, hydrocephalus, trigeminal neuralgia, tympanic hydrops and subjective neurological symptoms with normal neurological exam, magnetic resonance imaging and CSF analysis.

Human immune cell isolation and culture

Informed consent was obtained from every donor (MS, HC and OND) prior to sample collection, in accordance with institutional guidelines (CHUM research ethic committee approval number SL05.022 and 023 and BH07.001). CSF samples were obtained from subjects undergoing lumbar puncture for clinical indication. Cells were isolated from supernatant by centrifugation and immediately processed for flow cytometry analysis as previously published (Larochelle, Cayrol et al. 2012). PB was obtained by venous puncture and immune cells were isolated as previously published (Ifergan, Kebir et al. 2008) using density gradient centrifugation on Ficoll-Paque (GE Healthcare). Human CD8⁺ T lymphocytes and CD14⁺ lymphocytes were isolated using the MACS isolation columns. When indicated, following 3-5 days in culture, CD8⁺ T lymphocytes were further sorted using magnetic beads (positive selection) into MCAM⁺ and MCAM^{neg} lymphocytes according to the manufacturer's protocol (Miltenyi). Immune cell purity was routinely >95%. CD8⁺ T lymphocytes were cultured *in vitro* as follows: for non-specific activation 0.5X10⁶ cells/ml were cultured with

plate-bound anti-CD3 (2.5 µg/ml incubated 24h hours at 4°C; eBioscience, clone OKT3) and soluble anti-CD28 (BD Pharmingen, 2 µg/ml) in X-vivo 15 medium (Lonza) without serum and supplemented with 2 mM L-glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin (Sigma). When specified, CD8⁺ T lymphocytes were cultured with autologous CD14⁺ monocytes at a 1:0.6 ratio in the presence of soluble anti-CD3 (2.5 µg/ml). Cells were cultured for 4 days if not specified otherwise. Induction of MCAM by different cytokines was performed by adding specific cytokines daily to culture of CD8⁺ T lymphocytes with plate-bound anti-CD3 and soluble anti-CD28. The following cytokines were added daily alone or in combination as indicated: rhIL-1β (10 ng/ml), rhIL-2 (20 U/ml), rhIL-4 (200 ng/ml), rhIL-6 (20 ng/ml), rhIL-12 (20 ng/ml), rhIL-15 (1 ng/ml), rhIL-17 (100 ng/ml), rhIL-22 (100 ng/ml), rhIL-23 (25 ng/ml), rhIL-27 (100 ng/ml), rhGM-CSF (20 ng/ml, BD Biosciences), TNF (10 U/ml), IFN-γ (10 U/ml), TGF-β (5 ng/ml), or PBS (control) for 4 days. After *in vitro* culture, the presence of activation markers and the capacity to produce cytokines were assessed by flow cytometry or qPCR as previously described (Ifergan, Kebir et al. 2008, Kebir, Ifergan et al. 2009, Larochelle, Cayrol et al. 2012).

Active EAE disease induction and scoring

EAE was induced in 6-8 weeks old female C57BL/6 mice as previously published (Kebir, Ifergan et al. 2009, Larochelle, Cayrol et al. 2012). In brief, animals were immunized subcutaneously with 200 µg MOG₃₅₋₅₅ (MEVGWYRSPFSRVVHLYRNGK; Sheldon Biotechnology Center) in a 100 µl emulsion of Complete Freund Adjuvant (4 mg/ml *Mycobacterium tuberculosis*; Fisher Scientific). On day 0 and day 2, Pertussis toxin (400 ng, Sigma-Aldrich) was injected intra-peritoneally (i.p.). When indicated, animals were then injected i.p. every other day from day 10 with murinized αMCAM mAb (200 µg; gift from Prothena, clone 15 (Flanagan, Fitzgerald et al. 2012)) or mouse IgG isotype control (200 µg; BioXcell, MOPC-1). The scoring system used was as follows: 0 = normal; 1 = limp tail; 2 = slow righting-reflex; 3 = paralysis of one hindlimb (monoparalysis); 4 = paralysis of both hindlimbs (paraparalysis); 5, moribund (requires sacrifice). Mice were scored by an investigator blinded to the treatment group. For *in vitro* reactivation of immune cells, EAE animals were sacrificed at day 9 post-immunization, lymph nodes (LN) and spleens were

recovered and leukocytes were isolated as previously published (Ifergan, Kebir et al. 2011) and cultured with MOG_{35–55} (20 µg/ml). The following cytokines were added to culture alone or in combination as indicated: rhIL-2 (50 U/ml), rmIL-15 (1 ng/ml) (pre-incubated for 30 minutes with rmIL-15R), rmIL-12 (3 ng/ml), rmIL-23 (20 ng/ml), rmIL-6 (20ng/ml), hTGF-β (4 ng/ml). For any combination including TGF-β and/or IL-6 and/or IL-23, anti-IFN-γ antibodies (20µg/ml; BioXcell, clone XMG1.2) were added. Cells were then processed for analysis or sorting by flow cytometry.

Transfer EAE

Transfer EAE was performed as previously described (Larochelle, Cayrol et al. 2012). Briefly, active EAE was induced as described above except for PTX (200 ng) that was injected on day 0 only. On day 9, 40 mice were sacrificed and peripheral leukocytes were recovered from LN and spleens. Cells isolated from LN and spleens were cultured separately for 96h in RPMI supplemented with 10% FBS, non-essential amino acids, HEPES and β-ME. Reactivation of cells was performed in the presence of MOG_{35–55}, rhTGF-β, rmIL-6, rmIL-23, and anti-mIFN-γ. For LN, IL-2 and msIL-15/IL-15R were added on day 0. For splenocytes, only IL-15/IL-15R was added at 48h. Fresh complete medium (20% of initial volume) with rmIL-23 was added to all cultures on day 2. Cells were then harvested, washed in HBSS and then processed for sorting by flow cytometry. Sorted populations were as follows: total CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes, total CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes, and MCAM-depleted CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes. Sorted cells were washed in HBSS and 5 million CD3⁺CD4⁺ T lymphocytes were injected i.p. to all the recipient female C57BL/6 animals, in combination with 4 million of either total CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes or MCAM-depleted CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes. Recipient mice received a single dose of PTX (200 ng) i.p. on day 2 following transfer. The scoring system used was the same as described above.

TCR1640 transgenic model

Two couples of TCR1640 single transgenic mice, which express a TCR specific for MOG_{92–106}, were kindly provided by the group of Dr Wekerle (Pollinger, Krishnamoorthy et al. 2009). A TCR1640 colony was established in our animal facility for the last 4 years, backcrossing on

SJL/J background at every generation (from Jackson) to obtain heterozygous transgenic mice (TCR1640) and wild-type littermates (WT). Male animals usually display a chronic progressive course of disease, while female present more characteristically with relapsing-remitting course followed by variable recovery (own observations and (Pollinger, Krishnamoorthy et al. 2009). Therefore, only male animals were used to study the impact of MCAM blockade on chronic neurological disability.

EAE scoring scale for typical EAE was the same as described above. For ataxia (atypical EAE) scoring ranged from 0 to 5 (1 = head slightly turned and mild balance impairment, 2 = more pronounced head turn, animal tends to turn around and present festination or move backwards, righting reflex maneuver causes prolonged extension of one hindlimb, 3 = animal occasionally loses balance and fall on one side, 4 = animal roll over or lay on one side more than 50% of the time, 5 = muribund).

A global score was attributed to TCR 1640 mice based on functional impact of paralysis and/or ataxia as follows: 1.0 = do not control tail or mild balance impairment with mild head turn or both (1.5), 2 = righting reflex impaired either due to paralysis or ataxia or both (2.5), 3 = reaching a score of 3 on either or both (3.5) atypical and typical EAE scoring scale, 4 = reaching a score of 4 on either or both (4.5) atypical and typical EAE scoring scale, 5 = muribund.

When indicated, male animals were injected i.p. thrice weekly (Mon-Wed-Fri) from day 45 to day 80 with murinized α MCAM mAb (200 μ g; clone 15) or mouse IgG isotype control (200 μ g; clone MOPC-1).

All animal procedures were approved by the University of Montreal Animal Care committee and followed guidelines of the Canadian Council on Animal Care.

Intracellular staining for flow cytometry analysis

Extracellular and intracellular stainings were performed as previously described (Larochelle, Cayrol et al. 2012). Briefly, before intracellular cytokine staining (ICS), cells were activated for 4h30 with 1 μ g/mL ionomycin and 20 ng/mL phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA) in the presence of 2 μ g/mL brefeldin A (all from Sigma). After staining for surface antigens cells were then fixed and permeabilized in 4% (w/v) paraformaldehyde with 0.1% (w/v) saponin in Hank's Balanced Salt Solution for 10 minutes at room temperature before proceeding to

intracellular staining. The following antibodies were used for extracellular staining of human cells: CD3, CD4, CD6, CD8, CD11a, CD25, CD27, CD28, CD45RA, CD45RO, CD56, CD62L, CD69, CD95, CD146/MCAM, CD147, CD161, CD253, CCR6, and CCR7. For intracellular staining of human cytokines, the following antibodies were used: IFN- γ , IL-17, IL-22, Granzyme B (GzB), TNF, GM-CSF, IL-4, Perforin, and IL-2. All antibodies are from BD Biosciences except IL-17 from eBioscience, IL-22 from R&D Systems and MCAM from Miltenyi. For mouse material, immune cells isolated from lymph nodes, spleen and CNS were labeled with surface markers CD3, CD4, CD8, CD11b, CD44, CD45, and CD146/MCAM (all from BD Biosciences except MCAM from BioLegend, clone ME-9F1). ICS included antibodies specific for mouse IL-17, GM-CSF, TNF, GzB, and IFN- γ (all from BD Biosciences). Nonspecific background staining was assessed using appropriate fluorochrome-matched isotype antibodies. Cells were processed on the same day for analysis on a BD LSR II or sorted using a BD FACS Aria II (Becton Dickinson), and analyzed using the BD FACSDiva software (BD Bioscience).

Immunostaining of CNS material

Frozen sections of CNS autopsy specimen obtained from 3 RRMS patients (brain) and of CNS specimen obtained from mice following rapid intracardiac perfusion (brain and spinal cord) were studied as previously described (Ifergan, Wosik et al. 2006, Alvarez and Teale 2008, Kebir, Ifergan et al. 2009). First, active MS and EAE lesions, defined as areas of demyelination associated with intense perivascular immune cell infiltration, were identified by Luxol Fast Blue (LFB) and haematoxylin and eosin (H&E) staining. Sections adjacent to active lesions were selected for immunohistofluorescence. Following fixation in acetone for 10 minutes, sections were transferred to ethanol for 5 minutes, hydrated in PBS and blocked with serum 10%. Primary antibodies diluted in 3% species specific serum were incubated for 1h at room temperature. Following washes, secondary antibodies were incubated 40 min at room temperature. Sections were then mounted using gelvatol, containing Topro-3 (Invitrogen, 1:300) when indicated. Each experiment included negative controls (incubation with secondary antibodies alone). The following primary antibodies were used: rabbit anti-mouse (m) and human (h) MCAM (monoclonal, EPR3208 Abcam, 1:200), mouse anti-hIL-17 (monoclonal, R&D systems, 1:30), mouse anti-human IL-17 e660 (monoclonal, eBioscience,

clone eBio64CAP17), rat anti-mIL-17 (monoclonal, BD Pharmingen, clone TC11-18H10, 1:30), rat anti-h and anti-m CD8 (monoclonal, Vector labs, clone SP16, 1:200), mouse anti-hCD8 (monoclonal, BD Biosciences, clone RPA-T8, 1:50). Fluorescence acquisition was performed using a Leica Confocal Microscope SP5 platform (Leica Microsystems). Imaging processing and analysis was done using Leica LAS AF and ImageJ (NIH) softwares.

Real Time Quantitative-PCR

Activated (day 3-5) CD8⁺ T lymphocytes were magnetically sorted using two consecutive positive selections for MCAM positive cells (CD146 beads, Miltenyi). Sorting efficiency was confirmed by qPCR for MCAM, which confirmed MCAM levels ± 10 times higher in lymphocytes sorted as MCAM⁺ as compared to MCAM^{neg}. qPCR was performed as previously published (Pittet, Newcombe et al. 2011, Larochele, Cayrol et al. 2012). Total RNA was extracted using RNeasy Mini kit before RNA samples were transcribed into cDNA using Quantitect Reverse Transcription kit (according to the manufacturer's instruction, kits from Qiagen). Relative gene expression levels were determined using primers and TaqMan FAM-labeled MGB probes for FoxP3, GATA-3, T-bet, ROR- γ t, IL-22, GzB, IL-23Receptor (IL-23R), TGF- β , IFN- γ , IL-10, GM-CSF, IL-4, IL-17, and ribosomal 18S (VIC-labeled probe) (according to the manufacturer's instruction, all probes from Applied Biosystems). qPCR cycling was performed in a 7900HT Fast-Real-Time PCR System (Applied Biosystems) according to the default temperature settings. Gene-specific mRNA was normalized compared to endogenous control (*18S*) mRNA expression.

BBB adhesion and transmigration assay

BBB-ECs were isolated and cultured from non-epileptic surgical human CNS material as previously published (Ifergan, Wosik et al. 2006, Kebir, Kreymborg et al. 2007, Cayrol, Wosik et al. 2008). Informed consent was obtained from every donor prior to surgery (CHUM research ethic committee approval number HD04.046).

For adhesion assays, human BBB-ECs were grown to confluence in gelatin-coated T25 plastic flasks. Gelatin-coating without human BBB-ECs was used as control condition. On the day of the experiment, culture medium was removed from control and human BBB-ECs flasks and

replaced by fresh medium to which isolated *ex vivo* human CD8⁺ T lymphocytes (2X10⁶) were immediately added. Following 18h of co-culture, medium was harvested and a single PBS wash was performed. Cells retrieved from medium and PBS wash were considered non adherent (floating). Remaining adherent cells were then incubated with PBS-EDTA at 37° C for 5-10 minutes before diluted trypsin (1:10) was added for 30 seconds, followed by inactivation with serum. Cells retrieved following PBS-EDTA and trypsin incubation were considered adherent cells. Floating and adherent cells were washed and processed separately for FACS staining as described above. Gating strategy included elimination of doublets before gating on CD3⁺CD8⁺ cells for analysis of MCAM expression.

Transmigration assays were performed using a modified Boyden chamber as previously published (Ifergan, Wosik et al. 2006, Larochelle, Cayrol et al. 2012). Briefly, human BBB-ECs were grown to confluence on gelatin-coated 3 µm pore size Boyden chambers (Collaborative Biomedical Products) in culture medium supplemented with 40% astrocyte-conditioned medium. Antibodies specific for MCAM (P1H12, 40 µg/ml) or the appropriate isotype control (mIgG1, 40 µg/ml) were added 1 h prior to immune cells (antibodies from Chemicon, custom made). 1X10⁶ purified *ex vivo* or *in vitro* activated CD8⁺ T lymphocytes were allowed to migrate for 18h, before cells that transmigrated to the lower chamber were counted. Migration experiments were performed in triplicates for each donor, in all conditions.

CD107a mobilization assay

CD8⁺ T lymphocytes activated *in vitro* for 4 days were harvested and put in contact for 8h with adult human oligodendrocytes, in the presence of CD107a antibody (BD Biosciences) and of monensin (1µM, Sigma) (Saikali, Antel et al. 2010, Zaguia, Saikali et al. 2013). Control condition consisted of adjacent wells with coating medium but no oligodendrocytes. Ratio of effector cells (CD8⁺ T lymphocytes) to target cells (oligodendrocytes) was 10:1. CD8⁺ T lymphocytes were then harvested and processed for flow cytometry analysis. Gating strategy included elimination of doublets before gating on living CD3⁺CD8⁺ cells for analysis of MCAM and CD107a expression following exposure to oligodendrocytes or control condition. All experiments were performed in triplicates. The oligodendrocytes, isolated from surgical resection and maintained under basal culture conditions in accordance with the guidelines of

the Biomedical Ethics Unit of McGill University, were kindly provided by the group of Dr Jack Antel (D'Souza, Alinauskas et al. 1995, D'Souza, Bonetti et al. 1996, Wosik, Ruffini et al. 2004).

Killing assays

To assess killing capacity of MCAM⁺ versus MCAM^{neg} cells, CD8⁺ T lymphocytes activated *in vitro* for 4 days were collected and then separated in two groups: MCAM negative fraction where CD8⁺ T lymphocytes were depleted from MCAM⁺ cells using anti-CD146 magnetic beads (<5% MCAM⁺); MCAM positive fraction where CD8⁺ T lymphocytes were not depleted of MCAM⁺ cells (around 20-50% MCAM⁺). Cell suspension was then added to CFSE-labeled MO3.13 human oligodendrocytic cell line (McLaurin, Trudel et al. 1995) to a ratio of 1:1. Cells were co-culture for 18h prior to analysis by flow cytometry. Survival of target cells was measured as ratio of CFSE⁺CD8^{neg} cells:CFSE^{neg}CD8⁺ cells remaining after co-culture, as previously published (Schneider, Mohebiany et al. 2011). Target cell death was assessed using LIVE/DEAD Fixable dead cell kit (according to manufacturer's protocol, Invitrogen), gating on CD8^{neg}CFSE⁺ cells.

Statistical analyses

Statistical analyses were performed using PRISM GraphpadTM software and results are presented as the mean ± standard error of the mean (SEM). Paired or unpaired Students' *t*-test followed by Dunnett post-tests were performed where appropriate, and survival curve statistical analysis was performed with Mantel-Cox and Gehan-Breslow-Wilcoxon tests. Only *p* values < 0.05 were considered statistically significant.

Results

MCAM is strongly up-regulated on circulating CD8⁺ T lymphocytes during acute MS relapse and is expressed by CNS-infiltrating CD8⁺ T lymphocytes

MCAM expression on CD4⁺ T lymphocytes is associated with chronic inflammatory conditions and IL-17 production (Dagur, Tatlici et al. 2010, Dagur, Biancotto et al. 2011, Kamiyama, Watanabe et al. 2012, Larochelle, Cayrol et al. 2012). As CD8⁺ T lymphocytes are also associated with chronic inflammation, we sought to investigate the expression and regulation of MCAM on the surface of PB CD8⁺ T lymphocytes in MS and controls. The proportion of CD8⁺ and CD8⁺ CD45RO⁺ T lymphocytes expressing MCAM remains comparable in healthy controls (HC) and in most MS patient populations, as well as in other non-inflammatory CNS disorders (OND) (Fig.1A-B). However, a significant and striking increase in the proportion of CD8⁺ (Fig. 1A) and CD8⁺CD45RO⁺ (Fig. 1B) T lymphocytes expressing MCAM is observed in the PB (Fig. 1A-C) and in the CSF (Fig. 1C) of MS patient during an acute relapse. Conversely, a reduction in the proportion of MCAM-expressing CD8⁺CD45RO⁺ T lymphocytes is detected in patients treated with beta-interferon (IFN β), Glatiramer Acetate (GA), Fingolimod (FTY) or dimethyl fumarate (BG-12) (Fig. 1B). Moreover, numerous T lymphocytes co-expressing MCAM and CD8 are found in perivascular infiltrates of active lesions within CNS autopsy specimen obtained from RRMS patients (Fig. 1D). Overall, our data demonstrate that MCAM expression on CD8⁺ T lymphocytes is associated with disease activity and suggest a role for MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes in MS lesion formation.

MCAM is expressed on pro-inflammatory effector memory CD8⁺ T lymphocytes *ex vivo*

To evaluate whether MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes are regulatory or pro-inflammatory, we further characterized this subset *ex vivo* using the PB of MS patients and controls. We found that the majority of MCAM⁺ CD8⁺ T lymphocytes isolated from the PB of MS patients co-express CD161 and CCR6 (Fig. 2A), and that MCAM expression is associated with CD45RO, CD95 and CD147/extracellular matrix metalloproteinase inducer (EMMPRIN) (Fig. 2B),

suggesting a TC17 memory phenotype. Our characterization further demonstrate that *ex vivo* PB CD8⁺ T lymphocytes expressing MCAM are more frequently CD6⁺, CCR7^{neg}CD62L^{neg}, CD45RA^{neg}, CD28⁺, CD69⁺, CD25⁺, CD56⁺ and CD253⁺ (Supplementary Fig.1), consistent with an effector memory profile. In accordance, the percentage of cells expressing IL-17, IFN- γ , IL-17/IFN- γ , GM-CSF, IL-22 and TNF is increased in MCAM⁺ CD8⁺ T lymphocytes obtained from HC, RRMS patients and DMT-treated RRMS patients, as compared to MCAM^{neg} cells (Fig. 2C and D). We further found that the percentage of CD8⁺ T lymphocytes expressing Perforin, IL-4 and GzB are not significantly different (Fig. 2C) in MCAM⁺ and MCAM^{neg} subsets. Interestingly, the proportion of cells expressing IFN- γ and co-expressing IL-17 and IFN- γ is significantly higher in MCAM⁺ CD8⁺ T lymphocytes, as compared to MCAM^{neg} cells (Fig. 2D) and significantly higher in untreated RRMS subjects as compared to controls (Fig. 2C). We further found that nearly half of the IL-17/IFN- γ -double positive CD8⁺ T lymphocytes are MCAM⁺ (Fig. 2E), especially in MS patients. Finally, using CNS autopsy material obtained from MS patients we identified *in situ* cells co-expressing IL-17, MCAM and CD8 in active lesions (Fig. 2F). Taken together, our data demonstrate that MCAM is expressed on effector memory CD8 T lymphocytes secreting TNF, IL-17, IFN- γ , GM-CSF and IL-22, which are found in active MS lesions.

MCAM is expressed on cytotoxic CD8⁺ TC1 and TC17 lymphocytes *in vitro*

To identify the environmental cues contributing to enhanced MCAM expression on CD8⁺ T lymphocytes during acute MS relapses, we performed polyclonal activation of CD8⁺ T lymphocytes in the presence or absence of specific cytokines. Non-specific activation in the presence of anti-CD3 and either CD14⁺ cells or anti-CD28 results in a rapid and significant induction of MCAM expression on the surface of CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 3A). To confirm that activated MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes retain a TC1/TC17 profile, activated CD8⁺ T lymphocytes were sorted according to MCAM expression and analyzed for expression of transcription factors and cytokines by qPCR. While MCAM^{neg} cells express significantly higher levels of *FoxP3*, *IL-4* and *IL-10* mRNA, MCAM⁺ cells have significantly higher levels of *IL-17A* mRNA (Fig. 3B). Flow cytometry analyses revealed that *in vitro* activated MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes express significantly more IL-17, GM-CSF and TNF, granzyme B (GzB) and perforin than their MCAM^{neg} counterpart (Fig. 3C), confirming our data using *ex*

in vivo CD8 T lymphocytes. Furthermore, we found that the proportion of MCAM⁺ CD8 T lymphocytes is significantly increased in IL-17⁺ and IL-17⁺/IFN- γ ⁺-expressing cells, as compared cells to IL-4⁺ or IL-17^{neg}/IFN- γ ^{neg} (Fig. 3D). Finally, to evaluate the influence of different polarizing conditions on expression of MCAM, CD8⁺ T lymphocytes were activated in the presence of various cytokines and MCAM expression was assessed by flow cytometry. We found a significant induction of MCAM expression when CD8⁺ T lymphocytes are activated in TC17-polarizing conditions (TGF- β +IL-6+IL-23) or in the presence of cytokines of the IL-12 family, and combinations of those (Fig. 3E).

CD8⁺ T lymphocytes use MCAM to migrate across CNS-ECs

We and others have previously demonstrated that MCAM is expressed by human BBB-ECs, especially under inflammatory conditions (Larochelle, Cayrol et al. 2012, Duan, Xing et al. 2013). As MCAM is an adhesion molecule that can interact with itself (Staquicini, Tandle et al. 2008) and with laminin 411(Flanagan, Fitzgerald et al. 2012) (also expressed at the BBB), and as MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes are present in MS lesions, we aimed to evaluate whether MCAM is involved in the transmigration of CD8⁺ T lymphocytes across the BBB. We found that MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes are significantly enriched among CD8⁺ T lymphocytes adhering to primary cultures of human BBB-ECs as compared to non-adherent (floating) cells or to cells adhering to gelatin (Fig. 4A). Furthermore, anti-MCAM mAb significantly decreases the trans-BBB migration of both *ex vivo* (Fig. 4B) and *in vitro* activated (Fig. 4C) CD8⁺ T lymphocytes. These data demonstrate that CD8⁺ T lymphocytes interact with human CNS-ECs through MCAM, and suggest that CD8⁺ T lymphocytes use MCAM to transmigrate across the BBB.

MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes kill human oligodendrocytes

To evaluate the potential of MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes to contribute to the formation of demyelinating lesions in the CNS, we performed co-cultures of activated CD8⁺ T lymphocytes with human adult oligodendrocytes grown in primary culture. Following contact with oligodendrocytes, we found a significant up-regulation of MCAM expression on CD8⁺ T lymphocytes and increased expression of degranulation marker CD107a, especially on the surface of MCAM⁺ cells (Fig. 4D). To further assess the functional capacity of MCAM⁺CD8⁺

T lymphocytes to kill human oligodendrocytes, we used the oligodendrocytic cell line MO3.13 as target cells and assessed their survival following co-culture with activated CD8⁺ T lymphocytes (of which 20-50% are MCAM⁺) or with activated CD8⁺ T lymphocytes depleted for MCAM (MCAM^{neg}). The percentage of surviving MO3.13 targets was significantly lower following exposure to MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes, as compared to MCAM^{neg} cells (Fig. 4E). Conversely, the percentage of dying oligodendrocytic cells, as assessed by LIVE/DEAD assay and flow cytometry, was significantly higher following exposure of MO3.13 cells to MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes, as compared to MCAM^{neg} cells. Therefore our data demonstrate the lytic capacity of MCAM-expressing CD8 T lymphocytes and emphasize the encephalitogenic nature of these cells.

MCAM is expressed on encephalitogenic CD8⁺ T lymphocytes in EAE

To confirm that MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes play a role in the formation of inflammatory lesions of the CNS *in vivo*, and that MCAM represent therefore a valuable target to limit neuroinflammation, we assessed the expression of MCAM on CD8⁺ T lymphocytes in MOG₃₅₋₅₅-induced EAE mice at different time-points. Similar to our results in human MS, we found that MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes are present in EAE perivascular infiltrates *in situ* (Fig. 5A). A time-course analysis of MCAM expression by CD8⁺ T lymphocytes obtained from the lymph nodes (LN), spleen and CNS of MOG₃₅₋₅₅-immunized mice revealed that the increased proportion of CD8⁺ T cells expressing MCAM in the LN (maximal at day 4) precedes the increase in the spleen and in the CNS (maximal at day 8) (Fig. 5B). Of note, the proportion of MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes in the LN and spleens of EAE animals goes back to pre-immunization levels after the early acute phase (day 12), while the enrichment of MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes in the CNS is more persistent (until day 28) (Fig. 5B). We then sought to evaluate the impact of cytokines on MCAM induction following reactivation of CD8⁺ T lymphocytes in the presence of MOG₃₅₋₅₅. First, we confirmed that MCAM expression on murine CD8⁺ T lymphocytes is associated with an effector memory phenotype (CD44^{high}) (Fig. 5C), similar to our observations in human. Second, we found that expression of MCAM on CD8⁺ T lymphocytes derived from lymph nodes is significantly increased *in vitro* in the presence of Tc17-polarizing conditions and is enhanced further by IL-2/IL-15 (Fig. 5D). To assess the profile of MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes, CD8⁺ T lymphocytes were sorted

according to expression of MCAM and analyzed for cytokine expression by flow cytometry. Similar to our human data, MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes express significantly more IL-17, IFN- γ , IL-17/IFN- γ , and a trend towards higher GM-CSF and GzB levels as compared to the MCAM^{neg} CD8⁺ T lymphocyte population (Fig. 5E). To evaluate the pathogenic role of MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes *in vivo*, we then transferred a sub-pathogenic number of MOG₃₅₋₅₅-reactivated CD4⁺ T lymphocytes with either MOG₃₅₋₅₅-reactivated CD8⁺ T lymphocytes (13-15% MCAM⁺) or MCAM-depleted MOG₃₅₋₅₅-reactivated CD8⁺ T lymphocytes (< 0,5% MCAM⁺). C57BL/6 recipient animals injected with MCAM^{neg} CD8⁺ lymphocytes have a delayed and significantly milder EAE than recipient animals injected with MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 5F). This was paralleled by a decrease in the absolute number of infiltrating CD45^{hi} cells in the CNS (Fig. 5G) and a reduction of IL-17 lymphocytes in the CNS of MCAM^{neg}CD8⁺ lymphocytes recipient animals, as compared to those receiving MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes (Fig. 5H). We then sought to evaluate the capacity of an anti-MCAM blocking mAb to reduce clinical severity of EAE, when administered after the onset of symptoms. MOG₃₅₋₅₅-immunized C57BL/6 animals were treated with a murinized anti-MCAM mAb from day 10 (mean clinical scores of 2.0) every other day for 40 days, or with the appropriate mIgG isotype control. Therapeutic anti-MCAM treatments did not affect the maximal severity scores (at day 13-14), but resulted in a significant improvement of the motor scores in the chronic phase of the disease (Fig. 5I). These data demonstrate that therapeutic blockade of MCAM *in vivo* can reduce neurological disability in EAE.

MCAM blockade in a model of spontaneous EAE

To assess the relevance of MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes in chronic progressive neuroinflammatory processes, we used a TCR transgenic animal model of MS. In TCR1640 animals, CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes carry TCR that are specific for MOG₉₂₋₁₀₆. Male TCR1640 develop spontaneous signs of progressive EAE between day 45 and 120 (Fig. 6A-B). Expression of MCAM on *ex vivo* peripheral lymphocytes obtained from asymptomatic TCR1640 males (35 days old) revealed a strong and significant increase in the percentage of CD8⁺ T lymphocytes expressing MCAM, as compared to wild-type littermates (Fig. 6C). Moreover, the proportion of MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes is significantly increased in the CNS of TCR1640 animals in pre-symptomatic and symptomatic phase of the disease, as

compared to wild-type littermates (Fig. 6D). Finally, to evaluate the therapeutic potential of anti-MCAM mAb on spontaneous EAE, we injected presymptomatic male TCR1640 with murinized anti-MCAM mAb i.p. three times a week for 5 weeks and followed their clinical scores for 130 days. TCR1640 animals that received anti-MCAM blocking mAb have a significantly delayed EAE (25 days) and significantly reduced mean clinical scores, as compared to those receiving the isotype control (Fig. 6E). Furthermore, none of the animals injected with anti-MCAM mAb reached a score > 2.0 , while 4/7 animals injected with the isotype control reached the endpoint of score >2.0 (Fig 6F). These data are strongly supportive of the role of MCAM in the development of EAE, and of the efficacy of MCAM blockade to control severity of EAE.

Discussion

While the contribution of MHC class I alleles HLA-A to MS susceptibility is established (International Multiple Sclerosis Genetics, Wellcome Trust Case Control et al. 2011), and the presence of CD8⁺ T lymphocytes in MS lesions undisputable (Hauser, Bhan et al. 1986, Monteiro, Hingorani et al. 1995, Babbe, Roers et al. 2000, Skulina, Schmidt et al. 2004, Lucchinetti, Popescu et al. 2011), the exact contribution of CD8⁺ T lymphocytes to MS pathogenesis is not yet fully understood (Denic, Wootla et al. 2013, Gravano and Hoyer 2013). The increased frequency of CD161⁺CD8⁺ T cells in the PB and of IL-17⁺CD8⁺ T cells in the CNS of subjects affected by MS however suggest a pathogenic role for Tc17 lymphocytes in MS (Tzartos, Friese et al. 2008, Annibaldi, Ristori et al. 2011, Abrahamsson, Angelini et al. 2013, Denic, Wootla et al. 2013, Huber, Heink et al. 2013). Data derived from EAE relating to the contribution of CD8⁺ T lymphocytes remain controversial and do not allow to draw a final conclusion. This is in part due to the fact that EAE is a model relying primarily on CD4 activation, as opposed to virus-driven demyelination models (Denic, Wootla et al. 2013). However, much of the controversy regarding the pathogenic or protective role of CD8 in MS and EAE arise from the fact that subsets of CD8⁺ T lymphocytes are not as well defined as for CD4: subpopulations of CD8⁺ T lymphocytes exhibit pro-inflammatory function (Ciric, El-behi et al. 2009, Annibaldi, Ristori et al. 2011, Abrahamsson, Angelini et al. 2013), while others exhibit suppressive or regulatory function (Gilliet and Liu 2002, Najafian, Chitnis et al. 2003, Correale and Villa 2010). Novel specific cell surface markers of CD8⁺ T lymphocytes subsets are therefore needed to improve our understanding of the role of these cells in the initiation and perpetuation of neuroinflammation. The findings presented herein, using blood and CNS samples of human affected with MS, and supported by data using two different EAE models demonstrate that MCAM is a reliable and stable surface marker for pathogenic CD8⁺ T cells in MS and EAE, a biomarker for MS disease activity, and a therapeutic target to decrease chronic neurological deficits in MS.

Our data demonstrate that the proportion of CD8⁺ T lymphocytes expressing MCAM is strongly and significantly elevated in the blood and CSF of MS subjects during acute relapse, this proportion being considerably higher than those found in other inflammatory disorders (Hadjinicolaou, Wu et al. 2013, Dagur, Biancotto et al. 2014). It is also much higher than what

is observed in the CD4⁺ T lymphocytes subset (Larochelle, Cayrol et al. 2012). Most importantly, we report that MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes and MCAM⁺IL-17⁺CD8⁺ T lymphocytes are present in the perivascular infiltrates characteristic of CNS lesions in MS. This data suggest that expression of MCAM on CD8⁺ T lymphocytes is closely associated with disease activity, and identifies encephalitogenic CD8⁺ T lymphocytes.

Further analysis of MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes both *ex vivo* and *in vitro* confirmed that these cells have an effector memory Tc17/Tc1 profile. MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes express significantly more CD161, which acts as a co-stimulatory factor and whose expression on CD8⁺ T lymphocytes is associated with a pro-inflammatory phenotype (Annibali, Ristori et al. 2011, Abrahamsson, Angelini et al. 2013). Moreover, MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes express CCR6 and CD147, respectively associated with migration to the CNS and activation of MMPs and invasion of CNS parenchyma (Reboldi, Coisne et al. 2009, Agrawal, Silva et al. 2011, Agrawal and Yong 2011). When compared to the MCAM^{neg} subset, MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes also express more CD28, and less IL-10, IL-4 and FoxP3, confirming that they are not regulatory lymphocytes (Gilliet and Liu 2002, Najafian, Chitnis et al. 2003, Biegler, Yan et al. 2006, Correale and Villa 2010, Gravano and Hoyer 2013). Moreover, MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes express significantly more IL-17, as assessed by flow cytometry and by qPCR, confirming their Tc17 phenotype. Similar to recent observations in TH17, there is increasing evidence that Tc17 are plastic and can proliferate, co-express T-bet and ROR- γ , produce both IL-17 and IFN- γ , and acquire pronounced cytotoxic function upon IL-12 stimulation (Annibali, Ristori et al. 2011, Tajima, Wakita et al. 2011, Satoh, Tajima et al. 2012). Sarin *et al.* have recently shown that polymorphisms in the IL-23R gene leads to decreased IL-23 signalling, reduces number of circulating TC17 and confers a significant protection against autoimmune diseases (Sarin, Wu et al. 2011). Our own findings demonstrate that cytokines of the IL-12 family drives MCAM expression on CD8⁺ T lymphocytes, and more so in combination with IL-23. Furthermore, we demonstrate that MCAM is not only associated with expression of IL-17, but also with IFN- γ , GM-CSF, TNF and cytolytic enzymes, suggesting that MCAM identifies CD8⁺ T lymphocytes of a mixed TC17/TC1 phenotype. Most importantly, MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes display an enhanced killing capacity of human CNS cells. The mechanisms underlying the capacity of MCAM⁺CD8⁺ to lyse

oligodendrocytes and neurons require further analysis, but are likely multiple, as IFN- γ , TNF, Fas, GzB and perforin have all been previously implicated in CD8 killing capacity (for review see (Denic, Wootla et al. 2013)), and are associated with MCAM expression on CD8. This strongly suggest that MCAM⁺CD8⁺ cells can participate to CNS damage in MS and would potentially constitute a therapeutic target to decrease cumulative neurological deficits.

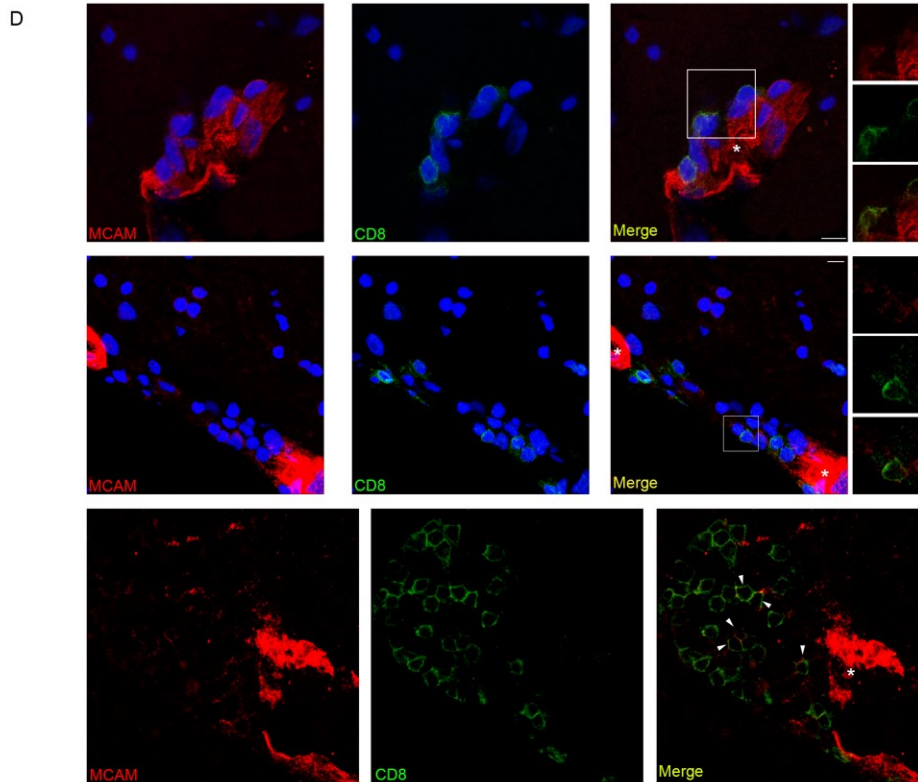
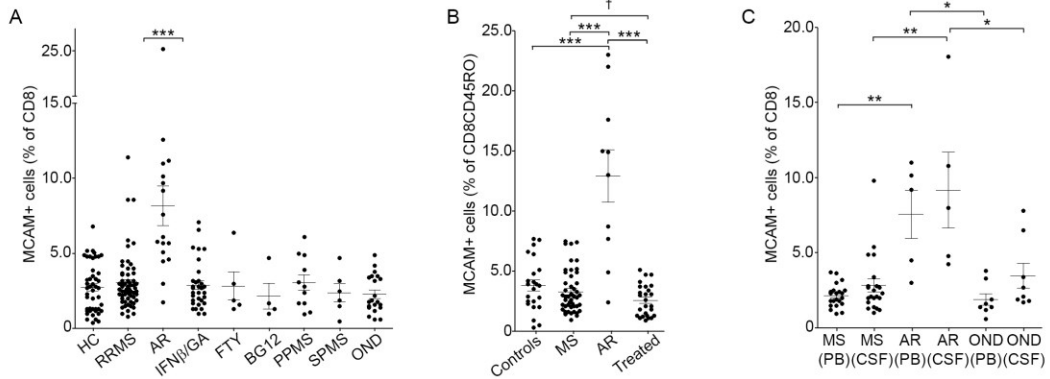
To uncover the encephalitogenic potential of MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes, we opted for a CD4/CD8 co-transfer experiment. A suboptimal number (5×10^6 i.p., unpublished data) of MOG₃₅₋₅₅-reactivated CD4⁺ T lymphocytes was transferred into a naïve WT recipient with either MOG₃₅₋₅₅ reactivated MCAM-depleted CD8⁺ T lymphocytes, or with non-depleted MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes. As expected, and according to the demonstration of the pathogenic role of Tc17 lymphocytes in EAE (Huber, Heink et al. 2013), co-transfer of MCAM-depleted CD8⁺ T lymphocytes resulted in a milder and delayed EAE, which was paralleled by a decrease in the absolute number of CNS-infiltrating cells, as well as in the absolute number of IL-17⁺CD3⁺ lymphocytes in the CNS. Finally, MCAM blockade *in vivo* prevented development of clinically significant chronic neurologic deficits in the spontaneous TCR 1640 EAE model.

Collectively, our data suggest that MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes are encephalitogenic Tc17/Tc1 cells that are associated with MS disease activity and that can induce damage to CNS resident cells. These data are in strong support of a pathogenic role of MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes in neuroinflammation and suggest that MCAM blockade or depletion could represent a promising therapeutic strategy to impact on long term disability in MS.

Acknowledgments

This study was supported by operating grants from the Canadian Institutes of Health Research (CIHR, MOP89885) and the Multiple Sclerosis Society of Canada (MSSC). C.L., M.C., O.S.L. and I.I. hold scholarships and fellowships from the MSSC. M.A.L. holds a scholarship from FRSQ. R.C., J.I.A and H.K. hold scholarships and fellowships from the CIHR. N.A. holds a New Investigator Award from the CIHR. A.P. holds a Senior Scholar Award of the Fonds de Recherche du Québec-Santé.

Figure 1



Figures

Figure 1: Acute relapses of MS are associated with increased frequency of MCAM⁺ CD8 T lymphocytes. (A) Expression of MCAM by *ex vivo* CD8⁺ T lymphocytes obtained from the peripheral blood (PB) of healthy controls (HC, *n* = 46), untreated MS patients in remission (RRMS, *n* = 62), acutely relapsing RRMS (AR, *n* = 17), remitting RRMS under treatment with beta interferon or glatiramer acetate (IFN β or GA, *n* = 32), with fingolimod (FTY, *n* = 5), with dimethyl fumarate (BG-12, *n* = 4), primary progressive MS (PPMS, *n* = 11), secondary progressive MS (SPMS, *n* = 6), and other neurological diseases (OND, *n* = 21). *** *p* < 0.001 as compared to all other groups. (B) Expression of MCAM by *ex vivo* CD8⁺CD45RO⁺ T lymphocytes obtained from the PB of controls (HC and OND; *n* = 23), RRMS patients untreated and in remission (MS, *n* = 48), acutely relapsing RRMS (AR, *n* = 10) and RRMS patients under treatment and in remission (treated, *n* = 26). *** *p* < 0.001 as compared to controls, untreated and treated MS. † *p* = 0.1067 as compared to untreated MS. (C) Expression of MCAM by *ex vivo* CD8⁺ T lymphocytes obtained from the PB or cerebrospinal fluid (CSF) of RRMS patients untreated and in remission (MS, *n* = 22), acutely relapsing RRMS (AR, *n* = 5) and other neurological diseases (OND, *n* = 8). * *p* < 0.05, ** *p* < 0.01. For A-C 1 dot = 1 donor. Horizontal lines are mean \pm S.E.M. (D) Expression of MCAM (red) and CD8 (green) in active MS lesions as assessed by Luxol Fast Blue/Hematoxylin and Eosin (LHE) staining of adjacent section (right panels). Asterisks identify blood vessels. Arrowheads identify co-localization of MCAM and CD8. Representative of *n* = 3 MS patients, total of 10 lesions, in 6 distinct sections. Nuclei are in blue. Scale bar = 10 μ m. High power views of infiltrating cells are shown on right panels.

Figure 2

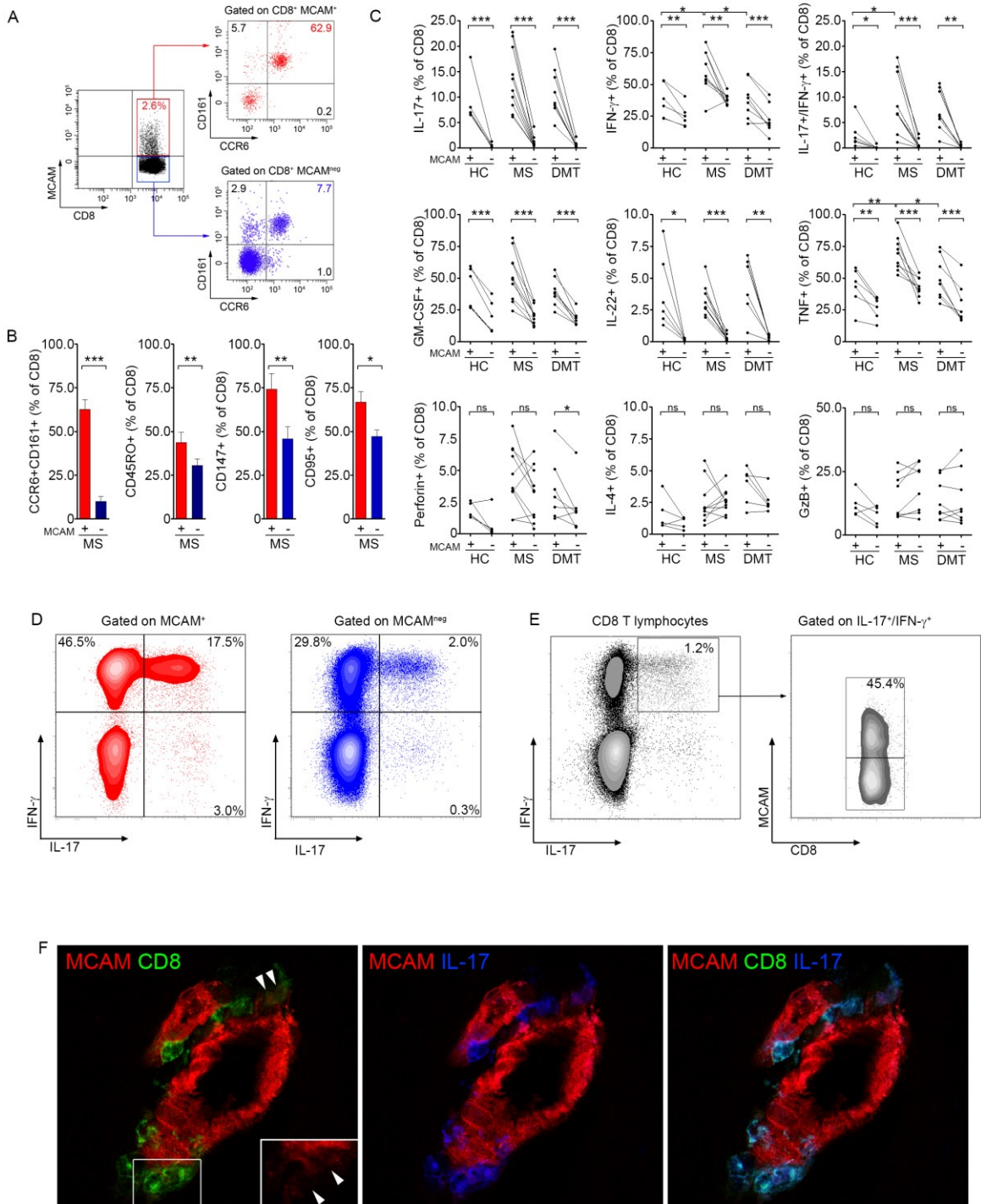


Figure 2: MCAM expression on human circulating CD8 T lymphocytes is associated with an effector memory TC17/TC1 phenotype. **(A)** Representative dot plots of CCR6 and CD161 expression and **(B)** frequency of CCR6⁺CD161⁺, CD45RO⁺, CD147⁺ and CD95⁺ in MCAM⁺ (red) versus MCAM^{neg} (blue) CD8⁺ T lymphocytes, as assessed by flow cytometry analysis of freshly isolated CD8⁺ T lymphocytes from untreated RRMS patients, gating on MCAM⁺ (+) versus MCAM^{neg} (-) lymphocytes. $n \geq 4$ donors. **(C)** Expression of IL-17, IFN- γ , IL-17/IFN- γ , GM-CSF, IL-22, TNF, perforin, IL-4 and GzB by *ex vivo* CD8⁺ T lymphocytes from healthy controls (HC), untreated RRMS patients (MS) and RRMS patients treated with beta interferon or glatiramer acetate (DMT). Cytokine expression was assessed by flow cytometry, gating on MCAM⁺ (+) versus MCAM^{neg} (-) lymphocytes. $n \geq 5$ donors for each group. 1 pair of dot = 1 donor. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **(D)** Expression of IL-17 and IFN- γ by *ex vivo* MCAM⁺ versus MCAM^{neg} CD8⁺ T lymphocytes freshly isolated from PB of untreated RRMS patients. Data shown are representative dot plots obtained by flow cytometry. $n \geq 9$ donors. **(E)** Expression of MCAM by IL-17/IFN- γ double positive CD8⁺ T lymphocytes *ex vivo*. Representative dot plots of untreated RRMS patients. $n \geq 9$ donors. **(F)** Expression of MCAM (red), CD8 (green) and IL-17 (blue) in active MS lesions. Arrowheads identify MCAM, CD8 and IL-17 co-localization. Representative of $n = 3$ MS patients, total of 4 lesions. Scale bar = 10 μm . High power views of infiltrating cells are shown on left panel. ns = not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 3

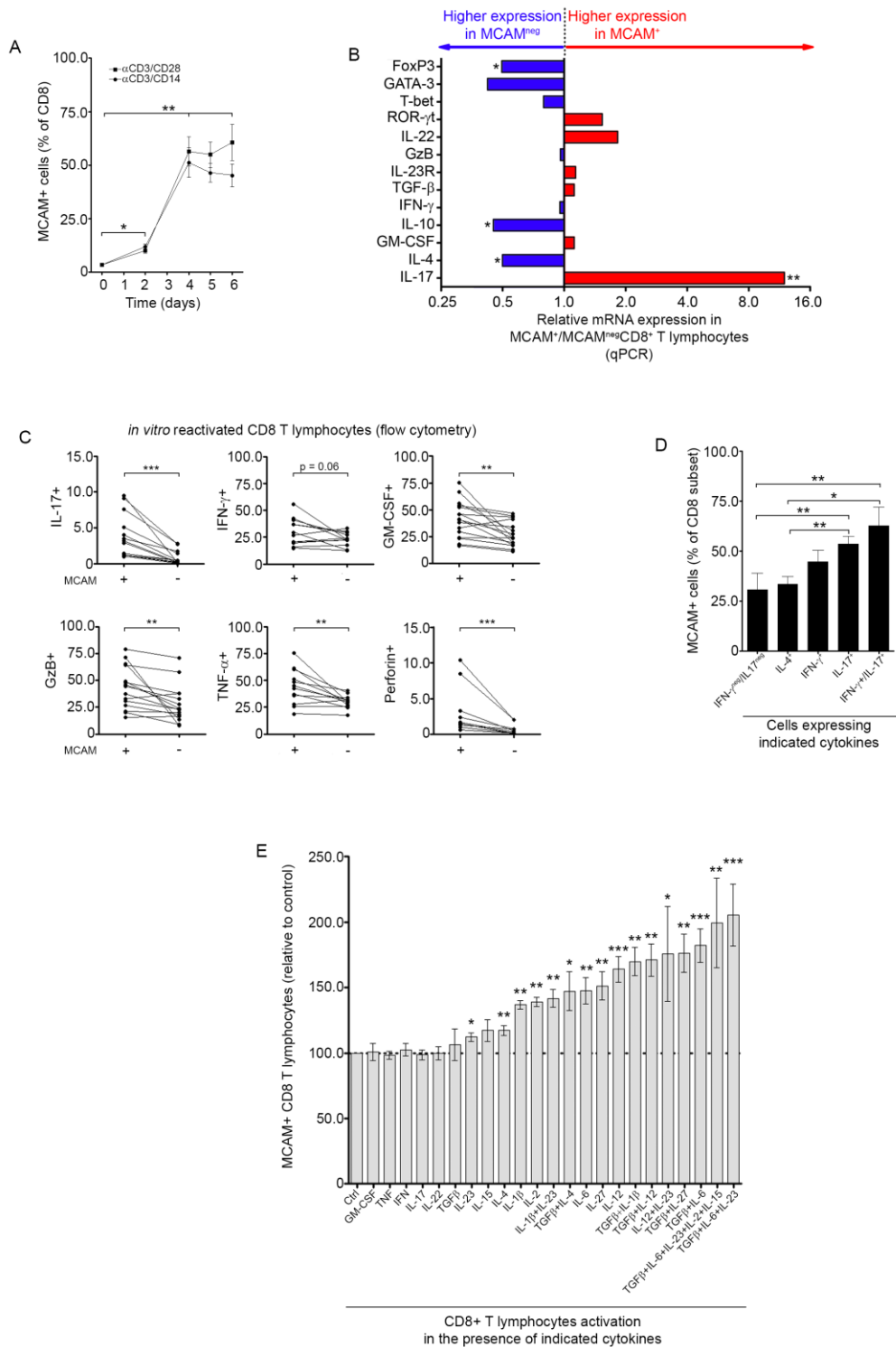


Figure 3: Activation induces MCAM expression by human CD8⁺ T lymphocytes exhibiting an inflammatory/cytotoxic phenotype. **(A)** Time-course expression of MCAM on CD8 T lymphocytes during non-specific activation. Activation in the presence of α CD3 and autologous antigen-presenting cells (APC) or with plate-bound α CD3 and soluble α CD28 (PB). $n \geq 4$ donors for each time-point and each condition, as assessed by flow cytometry. **(B)** qPCR analysis of *FoxP3*, *GATA-3*, *T-bet*, *ROR- γ* , *IL-22*, *GzB*, *IL-23R*, *TGF- β* , *IFN- γ* , *IL-10*, *GM-CSF*, *IL-4* and *IL-17A* mRNA by CD8 T lymphocytes activated non-specifically *in vitro* with α CD3/ α CD28. Following 3-5 days of activation, cells were sorted according to MCAM expression and were analyzed by qPCR; $n \geq 6$ donors. Results are presented as ratios (MCAM⁺/MCAM^{neg}) of mRNA transcripts expression, relative to *18S*. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **(C)** Expression of IL-17, IFN- γ , GM-CSF, GzB, TNF and perforin by activated CD8⁺ T lymphocytes from healthy controls. Isolated CD8⁺ T lymphocytes were activated non-specifically *in vitro* with α CD3/ α CD28 for 4 days before cytokine expression was assessed by flow cytometry, gating on MCAM⁺ (+) versus MCAM^{neg} (-) lymphocytes. $n \geq 11$ donors for each group. 1 pair of dot = 1 donor. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$. **(D)** Frequency of MCAM⁺ cells in different subsets of CD8⁺ T lymphocytes according to cytokine expression. $n \geq 5$ donors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. **(E)** Expression of MCAM by CD8⁺ T lymphocytes following *in vitro* activation for 4 days with anti-CD3/CD28 (Ctrl) in the presence of indicated cytokines. $n \geq 4$ donors of each condition, as assessed by flow cytometry. Results are presented as relative to control condition. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, as compared to control condition.

Figure 4

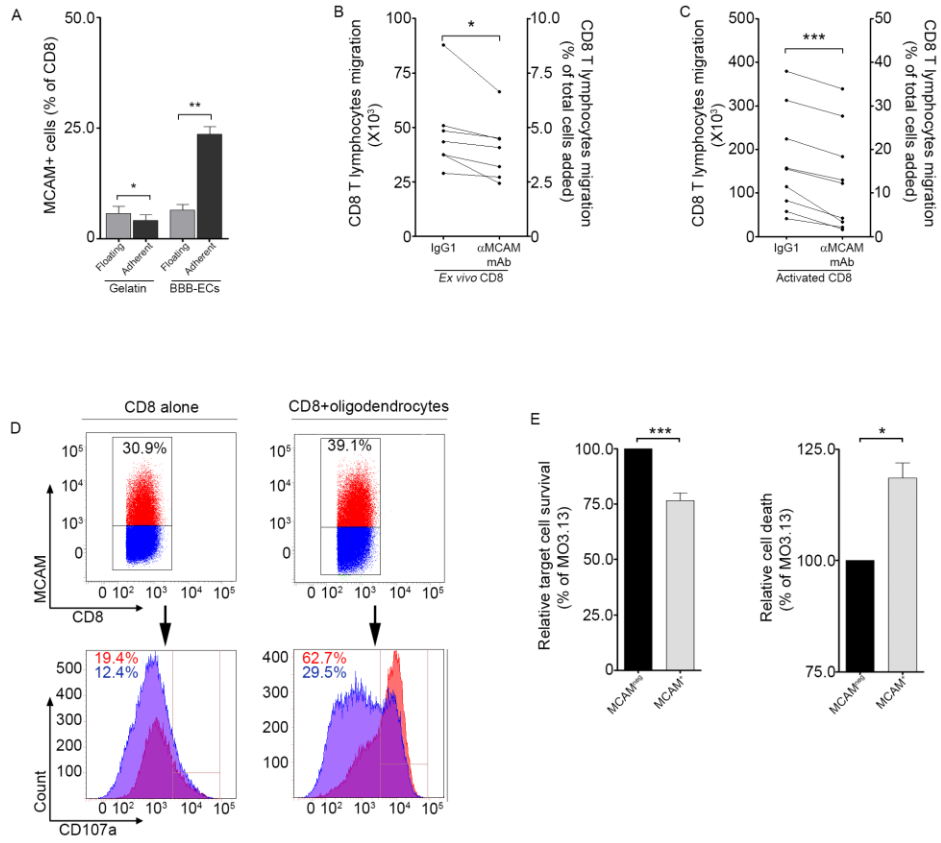


Figure 4: Human CD8⁺ T lymphocytes use MCAM to migrate across the BBB, and MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes show an increased killing of oligodendrocytes *in vitro*. **(A)** Expression of MCAM by human CD8⁺ T lymphocytes floating over versus adhering to human BBB-ECs. Freshly isolated CD8⁺ T lymphocytes were put over gelatin or a confluent monolayer of BBB-ECs in primary culture for 18h before MCAM expression was assessed by flow cytometry, gating on CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes. $n \geq 4$ donors on 2 different preparations of human BBB-ECs. **(B-C)** Migration of *ex vivo* **(B)** and *in vitro* (activated for 4 days with α CD3/ α CD28) human CD8⁺ T lymphocytes across BBB-ECs in a modified Boyden chamber assay. 1×10^6 CD8⁺ T lymphocytes were allowed to migrate for 18h in the presence of either α -MCAM mAb (P1H12) or isotype control mAb (IgG1). $n = 4$ independent experiments using 3 different preparations of human BBB-ECs. 1 pair of dots = 1 donor. Each condition was performed in triplicates. Migration is expressed as absolute numbers (left axis) and as percentage of total cells added to the upper chamber (right axis). **(D)** CD8⁺ T lymphocytes activated *in vitro* for 4 days were stained for CD107a (degranulation marker) and added over human oligodendrocytes in primary culture or control coated plate, in the presence of monensin. Cells were in contact for 8h and CD8⁺ T lymphocytes were then harvested and analyzed by flow cytometry. Representative of $n = 4$ donors, $n = 2$ different preparations of human oligodendrocytes. **(E)** CD8⁺ T lymphocytes activated *in vitro* for 4 days were sorted according to MCAM expression and then added over CFSE-labeled MO3.13 (human oligodendrocytic cell line). Cells were in contact for 18h and then harvested before analysis by flow cytometry, gating on target cells (CFSE⁺CD8^{neg}) and effector cells (CFSE^{neg}CD8⁺). Ratio of target:effector cells was used to assess target cell survival, while target cell death was assessed using LIVE/DEAD Fixable dead cell kit. $n \geq 4$ donors. * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, as compared to control condition.

Figure 5

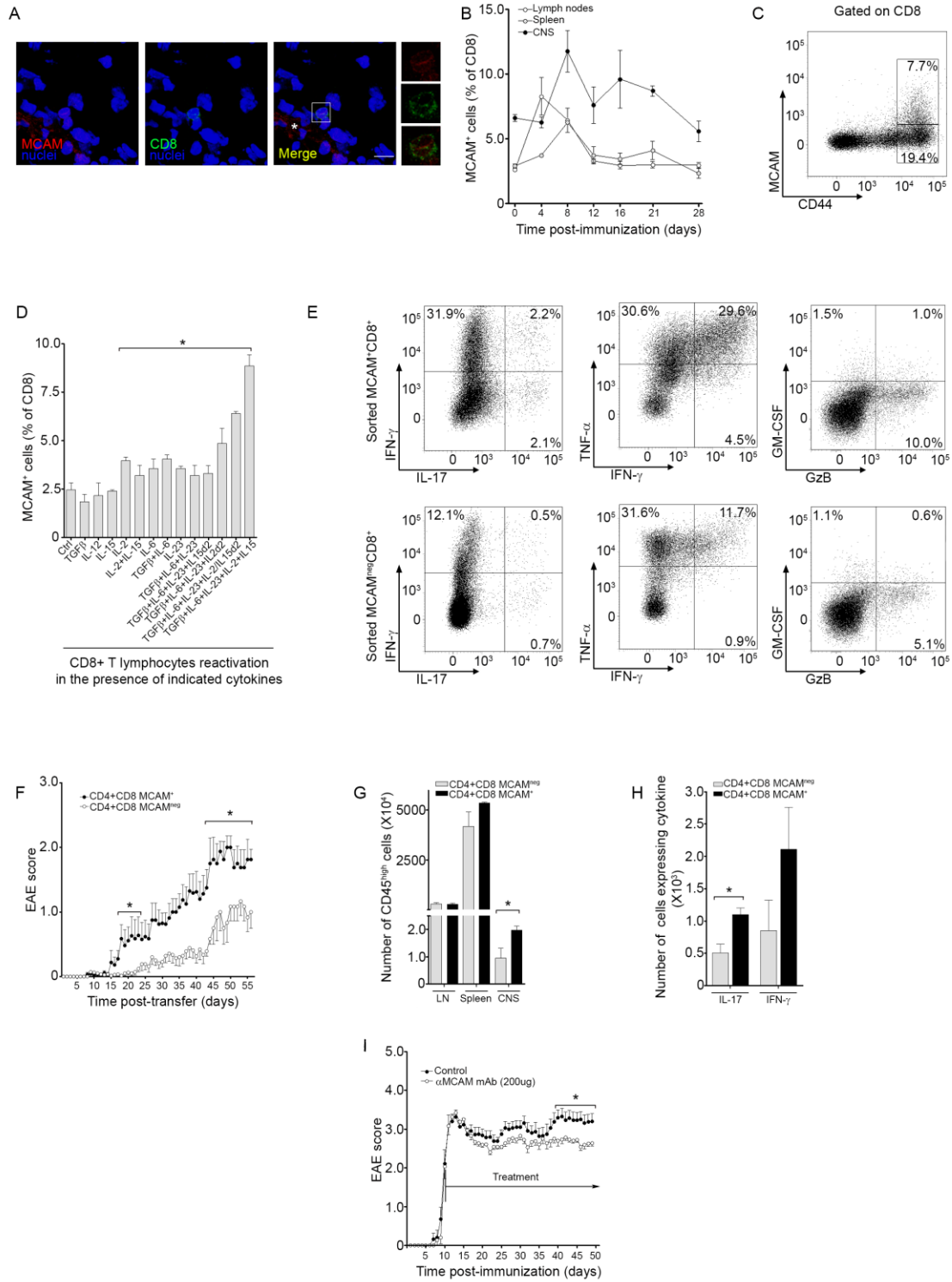


Figure 5: MCAM is up-regulated on CD8⁺ T lymphocytes during MOG-induced EAE and MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes contribute to disease severity and CNS infiltration. **(A)** Expression of MCAM (red) and CD8 (green) in CNS sections from MOG₃₅₋₅₅ immunized C57/BL6 animals. Nuclei = blue. Asterisks identify blood vessels. High power views of infiltrating cells are shown on right panels. Representative of $n = 4$ animals, 30 lesions studied. Scale bar = 10 μm . **(B)** Time-course expression of MCAM on CD8 T lymphocytes from the lymph nodes, spleen and CNS of MOG₃₅₋₅₅-immunized animals. Animals immunized with MOG₃₅₋₅₅ were sacrificed at indicated time-points and MCAM expression on CD8 was assessed by flow cytometry. **(C)** Representative flow cytometry dot plot of MCAM and CD44 expression by murine CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes. **(D)** Expression of MCAM by CD8⁺ T lymphocytes obtained from the lymph nodes of MOG₃₅₋₅₅-immunized animals. Cells were analyzed following 4 days of *in vitro* reactivation with MOG₃₅₋₅₅ in the presence of indicated cytokines. MCAM expression on CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes was analyzed by flow cytometry. $n = 2$ independent experiments with pooled lymph nodes from ≥ 8 mice. **(E)** Representative flow cytometry dot plots of IL-17, IFN- γ , TNF, GM-CSF and GzB expression by sorted total (MCAM⁺CD8⁺) versus MCAM-depleted (MCAM^{neg} CD8⁺) CD3⁺CD8⁺ T lymphocytes isolated from the lymph nodes of EAE animals and reactivated for 4 days *in vitro* in TC17 condition in the presence of MOG₃₅₋₅₅. **(F)** Clinical course of EAE following adoptive transfer of sorted MOG₃₅₋₅₅- reactivated total CD4⁺ T lymphocytes (subpathogenic number of CD4) and either total (filled circles) or MCAM-depleted (open circles) CD8⁺ T lymphocytes, into naive C57/BL6 recipient animals. Representative of two independent experiments, $n = 4$ animals per group. **(G)** Absolute numbers of immune cells in lymph nodes (LN), spleen and CNS of recipient animals and **(H)** absolute numbers of infiltrating CD3⁺ lymphocytes expressing IL-17, IFN- γ and TNF in the CNS of recipient animals following adoptive transfer of total CD4⁺ T lymphocytes with total ($n = 3$, black bars) or MCAM-depleted CD8⁺ T lymphocytes ($n = 3$, grey bars), as assessed by flow cytometry at day 56 post-transfer. **(I)** Clinical course of EAE in MOG₃₅₋₅₅-immunized C57BL/6 animals treated therapeutically with murinized αMCAM mAb (200 μg i.p., open circles) or isotype control (200 μg i.p., filled circles). Animals were injected intraperitoneally every other day from day 10 post-

immunization (therapeutic regimen). $n = 18$ animals/group. Bar charts and time course shown are mean \pm S.E.M. ns = not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Figure 6

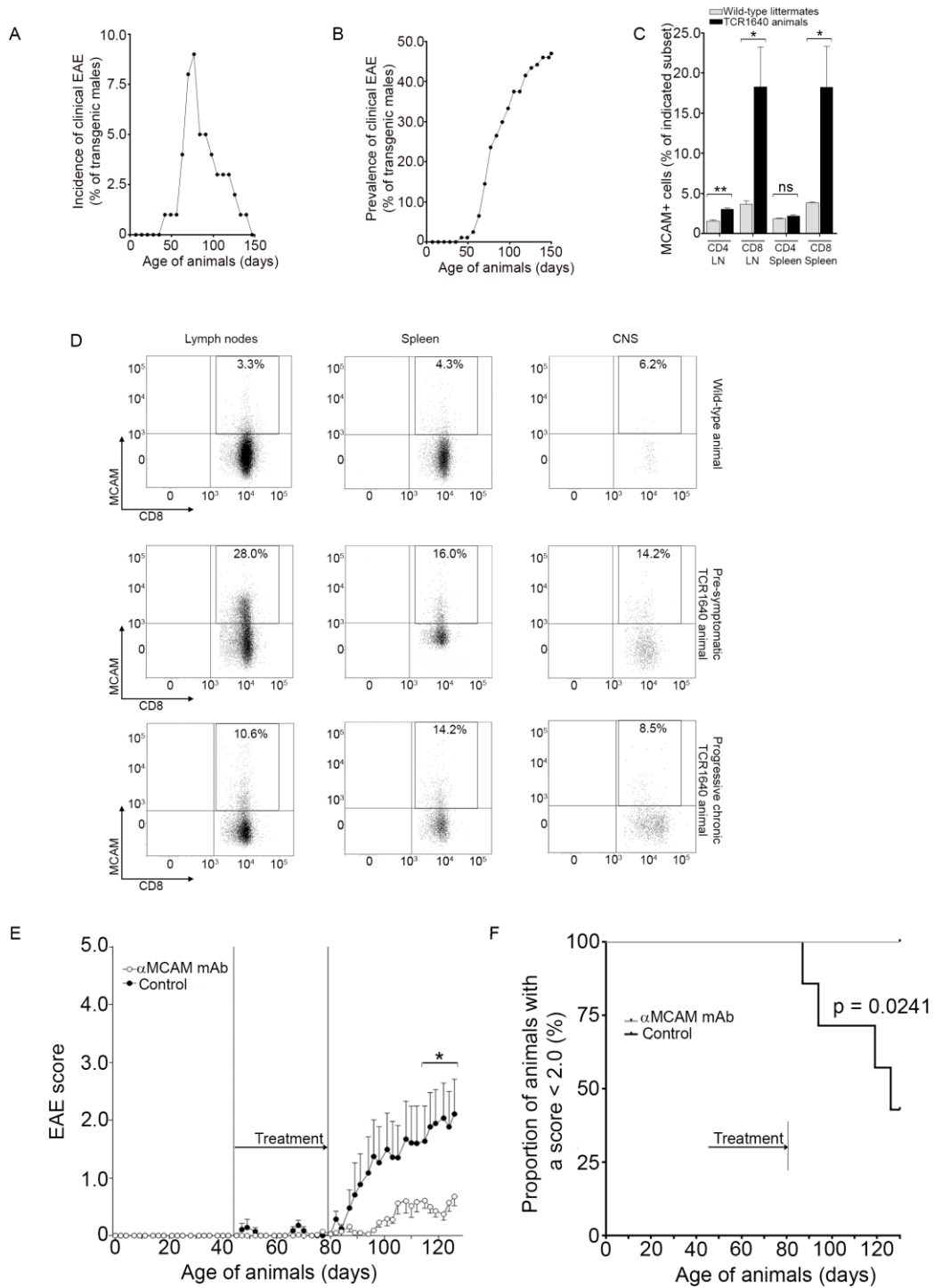
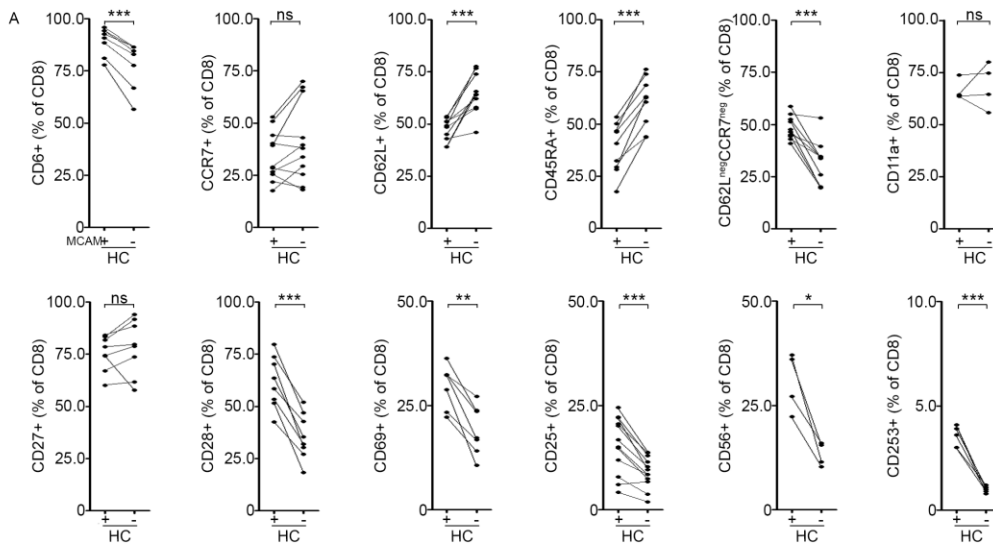


Figure 6: MCAM is up-regulated on CD8⁺ T lymphocytes from transgenic animals exhibiting spontaneous EAE and MCAM⁺CD8⁺ T lymphocytes contribute to chronic neurological disability in this model. **(A, B)** Characterization of incidence **(A)** and prevalence **(B)** of neurological symptoms (EAE symptoms) in males from our colony of TCR1640 transgenic mice. **(C)** Proportion of MCAM-expressing CD4⁺ and CD8⁺ T lymphocytes isolated from the LN and spleens of presymptomatic (35 days old) male TCR1640 animals versus wild-type littermates as assessed by flow cytometry. **(D)** Representative dot plots of MCAM expression by CD8⁺ T lymphocytes isolated from the lymph nodes (LN), spleen and CNS of presymptomatic (35 days old) and progressive chronically symptomatic (120 days old) animals, as compared to wild-type littermate. **(E-F)** Male TCR1640 transgenic animals were injected intraperitoneally thrice weekly from 45 days old (asymptomatic) to 80 days old, with murinized α MCAM mAb (200 μ g i.p) or isotype control (msIgG; 200 μ g i.p.). Representative of 2 independent experiments, with $n = 7-8$ animals/group. **(E)** Spontaneous disease course in male TCR1640 animals following prophylactic treatment with murinized α MCAM mAb (open circles) or isotype control (filled circles). **(F)** Survival curves for time to reach endpoint (defined as score > 2.0, representing clinically significant symptoms) for animals treated with murinized α MCAM mAb (grey line) or isotype control (black line). $p = 0.0241$. Bar charts and time course shown are mean \pm S.E.M. ns = not significant, * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$.

Supplementary Figure 1



Supplementary Figure 1: MCAM expression is associated with expression of CD6, CD28, CD69, CD56 and CD253. (A) Expression of indicated surface markers by freshly isolated CD8⁺ T lymphocytes from HC were analyzed by flow cytometry, gating on MCAM⁺ versus MCAM^{neg} subset. , * p < 0.05, ** p < 0.01, *** p < 0.001.

References

Abrahamsson, S. V., D. F. Angelini, A. N. Dubinsky, E. Morel, U. Oh, J. L. Jones, D. Carassiti, R. Reynolds, M. Salvetti, P. A. Calabresi, A. J. Coles, L. Battistini, R. Martin, R. K. Burt and P. A. Muraro (2013). "Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis." Brain **136**(Pt 9): 2888-2903.

Agrawal, S. M., C. Silva, W. W. Tourtellotte and V. W. Yong (2011). "EMMPRIN: a novel regulator of leukocyte transmigration into the CNS in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neurosci **31**(2): 669-677.

Agrawal, S. M. and V. W. Yong (2011). "The many faces of EMMPRIN - roles in neuroinflammation." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 213-219.

Alvarez, J. I. and J. M. Teale (2008). "Multiple expression of matrix metalloproteinases in murine neurocysticercosis: Implications for leukocyte migration through multiple central nervous system barriers." Brain Res **1214**: 145-158.

Anderson, A. C., R. Chandwaskar, D. H. Lee, J. M. Sullivan, A. Solomon, R. Rodriguez-Manzanet, B. Greve, R. A. Sobel and V. K. Kuchroo (2012). "A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4+ and CD8+ T and B cells." J Immunol **188**(5): 2084-2092.

Annibali, V., G. Ristori, D. F. Angelini, B. Serafini, R. Mechelli, S. Cannoni, S. Romano, A. Paolillo, H. Abderrahim, A. Diamantini, G. Borsellino, F. Aloisi, L. Battistini and M. Salvetti (2011). "CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis." Brain **134**(Pt 2): 542-554.

Babbe, H., A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friese, R. Schroder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid and K. Rajewsky (2000). "Clonal expansions of

CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction." J Exp Med **192**(3): 393-404.

Biegler, B. W., S. X. Yan, S. B. Ortega, D. K. Tennakoon, M. K. Racke and N. J. Karandikar (2006). "Glatiramer acetate (GA) therapy induces a focused, oligoclonal CD8+ T-cell repertoire in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **180**(1-2): 159-171.

Brucklacher-Waldert, V., K. Stuermer, M. Kolster, J. Wolthausen and E. Tolosa (2009). "Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis." Brain **132**(Pt 12): 3329-3341.

Cayrol, R., K. Wosik, J. L. Berard, A. Dodelet-Devillers, I. Ifergan, H. Kebir, A. S. Haqqani, K. Kreymborg, S. Krug, R. Moundjian, A. Bouthillier, B. Becher, N. Arbour, S. David, D. Stanimirovic and A. Prat (2008). "Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system." Nat Immunol **9**(2): 137-145.

Ciric, B., M. El-behi, R. Cabrera, G. X. Zhang and A. Rostami (2009). "IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells." J Immunol **182**(9): 5296-5305.

Codarri, L., G. Gyulveszi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, T. Suter and B. Becher (2011). "RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation." Nat Immunol. **12**(6):560-567.

Correale, J. and A. Villa (2010). "Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis." Ann Neurol **67**(5): 625-638.

D'Souza, S., K. Alinauskas, E. McCrea, C. Goodyer and J. P. Antel (1995). "Differential susceptibility of human CNS-derived cell populations to TNF-dependent and independent immune-mediated injury." J Neurosci **15**(11): 7293-7300.

D'Souza, S. D., B. Bonetti, V. Balasingam, N. R. Cashman, P. A. Barker, A. B. Troutt, C. S. Raine and J. P. Antel (1996). "Multiple sclerosis: Fas signaling in oligodendrocyte cell death." J Exp Med **184**(6): 2361-2370.

Dagur, P. K., A. Biancotto, E. Stansky, H. N. Sen, R. B. Nussenblatt and J. P. McCoy (2014). "Secretion of interleukin-17 by CD8+ T cells expressing CD146 (MCAM)." Clin Immunol **152**(1-2): 36-47.

Dagur, P. K., A. Biancotto, L. Wei, H. Nida Sen, M. Yao, W. Strober, R. B. Nussenblatt and J. Philip McCoy, Jr. (2011). "MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases." J Autoimmun. **37**(4): 36-47.

Dagur, P. K., G. Tatlici, M. Gourley, L. Samsel, N. Raghavachari, P. Liu, D. Liu and J. P. McCoy, Jr. (2010). "CD146+ T lymphocytes are increased in both the peripheral circulation and in the synovial effusions of patients with various musculoskeletal diseases and display pro-inflammatory gene profiles." Cytometry B Clin Cytom **78**(2): 88-95.

Denic, A., B. Wootla and M. Rodriguez (2013). "CD8(+) T cells in multiple sclerosis." Expert Opin Ther Targets **17**(9): 1053-1066.

Duan, H., S. Xing, Y. Luo, L. Feng, I. Gramaglia, Y. Zhang, D. Lu, Q. Zeng, K. Fan, J. Feng, D. Yang, Z. Qin, P. O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler and X. Yan (2013). "Targeting endothelial CD146 attenuates neuroinflammation by limiting lymphocyte extravasation to the CNS." Sci Rep **3**: 1687.

El-Behi, M., B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G. X. Zhang, B. N. Dittel and A. Rostami (2011). "The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF." Nat Immunol.

Flanagan, K., K. Fitzgerald, J. Baker, K. Regnstrom, S. Gardai, F. Bard, S. Mocci, P. Seto, M. You, C. Larochelle, A. Prat, S. Chow, L. Li, C. Vandever, W. Zago, C. Lorenzana, C. Nishioka, J. Hoffman, R. Botelho, C. Willits, K. Tanaka, J. Johnston and T. Yednock (2012). "Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS." PLoS One **7**(7): e40443.

Ghoreschi, K., A. Laurence, X. P. Yang, C. M. Tato, M. J. McGeachy, J. E. Konkel, H. L. Ramos, L. Wei, T. S. Davidson, N. Bouladoux, J. R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W. T. Watford, H. W. Sun, G. Eberl, E. M. Shevach, Y. Belkaid, D. J. Cua, W. Chen and J. J. O'Shea (2010). "Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling." Nature **467**(7318): 967-971.

Gilliet, M. and Y. J. Liu (2002). "Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **195**(6): 695-704.

Gravano, D. M. and K. K. Hoyer (2013). "Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells." J Autoimmun **45**: 68-79.

Hadjinicolaou, A. V., L. Wu, B. Fang, P. A. Watson, F. C. Hall and R. Busch (2013). "Relationship of CD146 expression to activation of circulating T cells: exploratory studies in healthy donors and patients with connective tissue diseases." Clin Exp Immunol **174**(1): 73-88.

Hauser, S. L., A. K. Bhan, F. Gilles, M. Kemp, C. Kerr and H. L. Weiner (1986). "Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions." Ann Neurol **19**(6): 578-587.

Hauser, S. L., E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould, C. H. Smith and H. T. Group (2008). "B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis." N Engl J Med **358**(7): 676-688.

Hoftberger, R., F. Aboul-Enein, W. Brueck, C. Lucchinetti, M. Rodriguez, M. Schmidbauer, K. Jellinger and H. Lassmann (2004). "Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions." Brain Pathol **14**(1): 43-50.

Huber, M., S. Heink, A. Pagenstecher, K. Reinhard, J. Ritter, A. Visekruna, A. Guralnik, N. Bollig, K. Jeltsch, C. Heinemann, E. Wittmann, T. Buch, O. Prazeres da Costa, A. Brustle, D. Brenner, T. W. Mak, H. W. Mittrucker, B. Tackenberg, T. Kamradt and M. Lohoff (2013). "IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis." J Clin Invest **123**(1): 247-260.

Huppert, J., D. Closhen, A. Croxford, R. White, P. Kulig, E. Pietrowski, I. Bechmann, B. Becher, H. J. Luhmann, A. Waisman and C. R. Kuhlmann (2010). "Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption." FASEB J **24**(4): 1023-1034.

Huseby, E. S., D. Liggitt, T. Brabb, B. Schnabel, C. Ohlen and J. Goverman (2001). "A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis." J Exp Med **194**(5): 669-676.

Ifergan, I., H. Kebir, J. I. Alvarez, G. Marceau, M. Bernard, L. Bourbonniere, J. Poirier, P. Duquette, P. J. Talbot, N. Arbour and A. Prat (2011). "Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on alpha4 integrin." Brain **134**(Pt 12): 3560-3577.

Ifergan, I., H. Kebir, M. Bernard, K. Wosik, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, N. Arbour and A. Prat (2008). "The blood-brain barrier induces differentiation of migrating monocytes into Th17-polarizing dendritic cells." Brain **131**(Pt 3): 785-799.

Ifergan, I., K. Wosik, R. Cayrol, H. Kebir, C. Auger, M. Bernard, A. Bouthillier, R. Moudjian, P. Duquette and A. Prat (2006). "Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: relevance to multiple sclerosis." Ann Neurol **60**(1): 45-55.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., C. Wellcome Trust Case Control, S. Sawcer, G. Hellenthal, M. Pirinen, C. C. Spencer, N. A. Patsopoulos, L. Moutsianas, A. Dilthey, Z. Su, C. Freeman, S. E. Hunt, S. Edkins, E. Gray, D. R. Booth, S. C. Potter, A. Goris, G. Band, A. B. Oturai, A. Strange, J. Saarela, C. Bellenguez, B. Fontaine, M. Gillman, B. Hemmer, R. Gwilliam, F. Zipp, A. Jayakumar, R. Martin, S. Leslie, S. Hawkins, E. Giannoulatou, S. D'Alfonso, H. Blackburn, F. Martinelli Boneschi, J. Liddle, H. F. Harbo, M. L. Perez, A. Spurkland, M. J. Waller, M. P. Mycko, M. Ricketts, M. Comabella, N. Hammond, I. Kockum, O. T. McCann, M. Ban, P. Whittaker, A. Kempainen, P. Weston, C. Hawkins, S. Widaa, J. Zajicek, S. Dronov, N. Robertson, S. J. Bumpstead, L. F. Barcellos, R. Ravindrarajah, R. Abraham, L. Alfredsson, K. Ardlie, C. Aubin, A. Baker, K. Baker, S. E. Baranzini, L. Bergamaschi, R. Bergamaschi, A. Bernstein, A. Berthele, M. Boggild, J. P. Bradfield, D. Brassat, S. A. Broadley, D. Buck, H. Butzkueven, R. Capra, W. M. Carroll, P. Cavalla, E. G. Celius, S. Cepok, R. Chiavacci, F. Clerget-Darpoux, K. Clysters, G. Comi, M. Cossburn, I. Cournu-Rebeix, M. B. Cox, W. Cozen, B. A. Cree, A. H. Cross, D. Cusi, M. J. Daly, E. Davis, P. I. de Bakker, M. Debouverie, B. D'Hooghe M, K. Dixon, R. Dobosi, B. Dubois, D. Ellinghaus, I. Elovaara, F. Esposito, C. Fontenille, S. Foote, A. Franke, D. Galimberti, A. Ghezzi, J. Glessner, R. Gomez, O. Gout, C. Graham, S. F. Grant, F. R. Guerini, H. Hakonarson, P. Hall, A. Hamsten, H. P. Hartung, R. N. Heard, S. Heath, J. Hobart, M. Hoshi, C. Infante-Duarte, G. Ingram, W. Ingram, T. Islam, M. Jagodic, M. Kabesch, A. G. Kermode, T. J. Kilpatrick, C. Kim, N. Klopp, K. Koivisto, M. Larsson, M. Lathrop, J. S. Lechner-Scott, M. A. Leone, V. Leppa, U. Liljedahl, I. L. Bomfim, R. R. Lincoln, J. Link, J. Liu, A. R. Lorentzen, S. Lupoli, F. Macciardi, T. Mack, M. Marriott, V. Martinelli, D. Mason, J. L. McCauley, F. Mentch, I. L. Mero, T. Mihalova, X. Montalban, J. Mottershead, K. M. Myhr, P. Naldi, W. Ollier, A. Page, A. Palotie, J. Pelletier, L. Piccio, T. Pickersgill, F. Piehl, S. Pobywajlo, H. L. Quach, P. P. Ramsay, M. Reunanen, R. Reynolds, J. D. Rioux, M. Rodegher, S. Roesner, J. P. Rubio, I. M. Ruckert, M. Salvetti, E. Salvi, A. Santaniello, C. A. Schaefer, S. Schreiber, C. Schulze, R. J. Scott, F. Sellebjerg, K. W. Selmaj, D. Sexton, L. Shen, B. Simms-Acuna, S. Skidmore, P. M. Sleiman, C. Smestad, P. S. Sorensen, H. B. Sondergaard, J. Stankovich, R. C. Strange, A. M. Sulonen, E. Sundqvist, A. C. Syvanen, F. Taddeo, B. Taylor, J. M. Blackwell, P. Tienari, E. Bramon, A. Tourbah, M. A. Brown, E. Tronczynska, J. P. Casas, N. Tubridy, A. Corvin, J. Vickery, J. Jankowski, P. Villoslada, H. S. Markus, K. Wang,

C. G. Mathew, J. Wason, C. N. Palmer, H. E. Wichmann, R. Plomin, E. Willoughby, A. Rautanen, J. Winkelmann, M. Wittig, R. C. Trembath, J. Yaouanq, A. C. Viswanathan, H. Zhang, N. W. Wood, R. Zuvich, P. Deloukas, C. Langford, A. Duncanson, J. R. Oksenberg, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, T. Olsson, J. Hillert, A. J. Iverson, P. L. De Jager, L. Peltonen, G. J. Stewart, D. A. Hafler, S. L. Hauser, G. McVean, P. Donnelly and A. Compston (2011). "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis." Nature **476**(7359): 214-219.

Jurewicz, A., W. E. Biddison and J. P. Antel (1998). "MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes." J Immunol **160**(6): 3056-3059.

Kamiyama, T., H. Watanabe, M. Iijima, A. Miyazaki and S. Iwamoto (2012). "Coexpression of CCR6 and CD146 (MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells." J Dermatol.
Kappos, L., D. Li, P. A. Calabresi, P. O'Connor, A. Bar-Or, F. Barkhof, M. Yin, D. Leppert, R. Glanzman, J. Tinbergen and S. L. Hauser (2011). "Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial." Lancet **378**(9805): 1779-1787.

Kebir, H., I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette and A. Prat (2009). "Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis." Ann Neurol **66**(3): 390-402.

Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher and A. Prat (2007). "Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation." Nat Med **13**(10): 1173-1175.

Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-240.

Larochelle, C., R. Cayrol, H. Kebir, J. I. Alvarez, M. A. Lecuyer, I. Ifergan, E. Viel, L. Bourbonniere, D. Beauseigle, S. Terouz, L. Hachehouche, S. Gendron, J. Poirier, C. Jobin, P. Duquette, K. Flanagan, T. Yednock, N. Arbour and A. Prat (2012). "Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system." Brain **135**(Pt 10): 2906-2924.

Leuenberger, T., M. Paterka, E. Reuter, J. Herz, R. A. Niesner, H. Radbruch, T. Bopp, F. Zipp and V. Siffrin (2013). "The role of CD8+ T cells and their local interaction with CD4+ T cells in myelin oligodendrocyte glycoprotein35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **191**(10): 4960-4968.

Lucchinetti, C. F., B. F. Popescu, R. F. Bunyan, N. M. Moll, S. F. Roemer, H. Lassmann, W. Bruck, J. E. Parisi, B. W. Scheithauer, C. Giannini, S. D. Weigand, J. Mandrekar and R. M. Ransohoff (2011). "Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis." N Engl J Med **365**(23): 2188-2197.

Maggi, L., V. Santarlasci, M. Capone, A. Peired, F. Frosali, S. Q. Crome, V. Querci, M. Fambrini, F. Liotta, M. K. Levings, E. Maggi, L. Cosmi, S. Romagnani and F. Annunziato (2010). "CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC." Eur J Immunol **40**(8): 2174-2181.

McLaurin, J., G. C. Trudel, I. T. Shaw, J. P. Antel and N. R. Cashman (1995). "A human glial hybrid cell line differentially expressing genes subserving oligodendrocyte and astrocyte phenotype." J Neurobiol **26**(2): 283-293.

Monteiro, J., R. Hingorani, R. Pergolizzi, B. Apatoff and P. K. Gregersen (1995). "Clonal dominance of CD8+ T-cell in multiple sclerosis." Ann N Y Acad Sci **756**: 310-312.

Najafian, N., T. Chitnis, A. D. Salama, B. Zhu, C. Benou, X. Yuan, M. R. Clarkson, M. H. Sayegh and S. J. Khoury (2003). "Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model." J Clin Invest **112**(7): 1037-1048.

Pittet, C. L., J. Newcombe, J. P. Antel and N. Arbour (2011). "The majority of infiltrating CD8 T lymphocytes in multiple sclerosis lesions is insensitive to enhanced PD-L1 levels on CNS cells." *Glia* **59**(5): 841-856.

Pollinger, B., G. Krishnamoorthy, K. Berer, H. Lassmann, M. R. Bosl, R. Dunn, H. S. Domingues, A. Holz, F. C. Kurschus and H. Wekerle (2009). "Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells." *J Exp Med* **206**(6): 1303-1316.

Polman, C. H., S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F. D. Lublin, X. Montalban, P. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, E. Waubant, B. Weinshenker and J. S. Wolinsky (2011). "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria." *Ann Neurol* **69**(2): 292-302.

Reboldi, A., C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt and F. 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." *Nat Immunol* **10**(5): 514-523.

Saikali, P., J. P. Antel, C. L. Pittet, J. Newcombe and N. Arbour (2010). "Contribution of astrocyte-derived IL-15 to CD8 T cell effector functions in multiple sclerosis." *J Immunol* **185**(10): 5693-5703.

Sarin, R., X. Wu and C. Abraham (2011). "Inflammatory disease protective R381Q IL23 receptor polymorphism results in decreased primary CD4+ and CD8+ human T-cell functional responses." *Proc Natl Acad Sci U S A* **108**(23): 9560-9565.

Satoh, T., M. Tajima, D. Wakita, H. Kitamura and T. Nishimura (2012). "The development of IL-17/IFN-gamma-double producing CTLs from Tc17 cells is driven by epigenetic suppression of Socs3 gene promoter." *Eur J Immunol* **42**(9): 2329-2342.

Schneider, R., A. N. Mohebiany, I. Ifergan, D. Beauseigle, P. Duquette, A. Prat and N. Arbour (2011). "B cell-derived IL-15 enhances CD8 T cell cytotoxicity and is increased in multiple sclerosis patients." J Immunol **187**(8): 4119-4128.

Skulina, C., S. Schmidt, K. Dornmair, H. Babbe, A. Roers, K. Rajewsky, H. Wekerle, R. Hohlfeld and N. Goebels (2004). "Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2428-2433.

Staquicini, F. I., A. Tandle, S. K. Libutti, J. Sun, M. Zigler, M. Bar-Eli, F. Aliperti, E. C. Perez, J. E. Gershenwald, M. Mariano, R. Pasqualini, W. Arap and J. D. Lopes (2008). "A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans." Cancer Res **68**(20): 8419-8428.

Sun, D., J. N. Whitaker, Z. Huang, D. Liu, C. Coleclough, H. Wekerle and C. S. Raine (2001). "Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice." J Immunol **166**(12): 7579-7587.

Tajima, M., D. Wakita, T. Satoh, H. Kitamura and T. Nishimura (2011). "IL-17/IFN-gamma double producing CD8+ T (Tc17/IFN-gamma) cells: a novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12." Int Immunol **23**(12): 751-759.

Tzartos, J. S., M. A. Friese, M. J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M. M. Esiri and L. Fugger (2008). "Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis." Am J Pathol **172**(1): 146-155.

van Oosten, B. W., M. Lai, S. Hodgkinson, F. Barkhof, D. H. Miller, I. F. Moseley, A. J. Thompson, P. Rudge, A. McDougall, J. G. McLeod, H. J. Ader and C. H. Polman (1997). "Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of

a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial." Neurology **49**(2): 351-357.

Wosik, K., F. Ruffini, G. Almazan, A. Olivier, J. Nalbantoglu and J. P. Antel (2004). "Resistance of human adult oligodendrocytes to AMPA/kainate receptor-mediated glutamate injury." Brain **127**(Pt 12): 2636-2648.

Zaguia, F., P. Saikali, S. Ludwin, J. Newcombe, D. Beauseigle, E. McCrea, P. Duquette, A. Prat, J. P. Antel and N. Arbour (2013). "Cytotoxic NKG2C+ CD4 T cells target oligodendrocytes in multiple sclerosis." J Immunol **190**(6): 2510-2518.

Discussion

La SEP est une maladie neurologique du SNC imprévisible et débilante, dont la cause demeure à ce jour indéterminée. Des interactions entre certains facteurs environnementaux et certains facteurs génétiques sous-tendent le développement et l'évolution de la maladie. Bien que la physiopathologie de la SEP soit encore mal comprise, l'infiltration du SNC par des leucocytes inflammatoires est indubitablement une étape critique dans la formation des lésions caractéristiques de la SEP. Certains traitements peuvent modifier l'activité de la maladie, toutefois un compromis entre des traitements moins efficaces mais sécuritaires et des traitements plus efficaces mais avec un potentiel d'effets secondaires sévères est encore malheureusement la réalité en clinique (Freedman, Selchen et al. 2013). De plus, il n'existe actuellement pas de biomarqueur reconnu en SEP pour faciliter le diagnostic, prédire l'activité de la maladie et évaluer la réponse aux différents traitements outre l'IRM, un examen pour lequel la lecture éclairée, le coût et l'accessibilité sont des facteurs contraignants.

Bloquer l'entrée des leucocytes dans le SNC en limitant leurs interactions avec la BHE par le biais d'un anticorps dirigé contre l'intégrine $\alpha_4\beta_1$, le ligand de la molécule d'adhérence endothéliale VCAM-1, est probablement la stratégie thérapeutique la plus efficace disponible actuellement. Toutefois, l'intégrine $\alpha_4\beta_1$ étant exprimée par une vaste proportion de leucocytes en circulation, il s'agit également de celle entraînant le plus haut risque d'infection virale du SNC par le virus JC, une infection morbide et même souvent fatale. De surcroît, la menace d'activité inflammatoire rebond après la cessation du traitement complique son arrêt, pourtant nécessaire lorsque le risque de LMP devient trop élevé. De nouvelles cibles thérapeutiques idéales en SEP seraient donc des molécules d'adhérence exprimées par la BHE en condition inflammatoire et dont les ligands seraient exprimés spécifiquement par les sous-populations leucocytaires encéphalitogéniques en SEP comme les TH17. De telles molécules pourraient théoriquement constituer à la fois des biomarqueurs et des avenues de traitement permettant d'atténuer la formation de plaques inflammatoires au sein du SNC tout en conservant la capacité d'effectuer l'immunosurveillance. De plus, l'identification de molécules de surface exprimées préférentiellement par les leucocytes pathogéniques en SEP

permettrait de mieux définir ces sous-populations et de raffiner la compréhension de la physiopathologie de la SEP.

Nous proposons ici MCAM comme potentiel biomarqueur et nouvelle cible thérapeutique prometteuse en SEP. Nous avons pu démontrer qu'il s'agit d'une molécule d'adhérence exprimée modérément par l'endothélium de la BHE et par une petite proportion des lymphocytes T CD4 et CD8 en circulation en contexte non inflammatoire, mais dont l'expression augmente significativement en poussée de SEP tant en périphérie que dans le SNC. Les cellules endothéliales de la BHE augmentent leur expression de MCAM en présence de TNF et d'IFN- γ et au sein des lésions démyélinisantes du SNC en SEP et en EAE. L'expression de MCAM à la surface des lymphocytes T est associée avec l'expression de plusieurs cytokines pro-inflammatoires (IL-17, IL-22, GM-CSF, TNF, IFN- γ , GzB, perforine) *ex vivo* et après activation, en particulier en présence d'IL-23, et est inversement corrélée avec l'expression de certaines cytokines anti-inflammatoires en SEP (IL-4, IL-10). De plus, MCAM n'est pas qu'un marqueur de surface des lymphocytes mémoire effecteurs pro-inflammatoires, il est exprimé par des lymphocytes T CD4 et CD8 retrouvés dans les infiltrats périvasculaires lésionnels en SEP et en EAE, et est utilisé par les TH17 et les CD8 pour traverser la BHE. En présence d'oligodendrocytes, les lymphocytes CD8 T activés exprimant MCAM présentent une capacité de lyse cellulaire supérieure, laissant croire que restreindre leur entrée dans le SNC pourrait diminuer le dommage infligé à la myéline et aux axones. L'amélioration de l'EAE par la déplétion ou le blocage de MCAM confirme la pertinence de ces observations *in vivo*. L'utilisation de MCAM comme biomarqueur et la neutralisation de MCAM ou la déplétion des cellules immunitaires périphériques MCAM⁺ comme avenue de traitement semblent donc prometteurs en SEP.

Nos résultats démontrant une augmentation de l'expression de MCAM par les cellules endothéliales de la BHE en condition inflammatoire *in vitro* ainsi qu'en SEP et en EAE *in situ* sont en accord avec l'expression endothéliale accrue préalablement rapportée au sein des portions de muqueuse inflammée en maladie inflammatoire intestinale (Bardin, Reumaux et al. 2006, Tsiolakidou, Koutroubakis et al. 2008), de muscles inflammés en polymyosite (Figarella-Branger, Schleinitz et al. 2006) et en réponse au TNF (Bardin, Blot-Chaubaud et al. 2009). Nos données ont également par la suite été confirmées en SEP et en EAE par un groupe

indépendant. Ce groupe a également pu démontrer l'importance en neuroinflammation de l'expression de MCAM par la BHE en utilisant un modèle de souris transgéniques chez qui la déficience en MCAM est restreinte aux cellules endothéliales. Les lésions du SNC et les déficits neurologiques cliniques secondaires à l'induction ou au transfert de l'EAE sont significativement plus légers chez ces souris n'exprimant pas MCAM sur leur BHE. Ceci est corrélé à une réduction significative du nombre de cellules CD4 et CD8 ainsi que des lymphocytes producteurs d'IFN- γ et d'IL-17 au sein du SNC, mais pas dans les organes lymphoïdes périphériques (Duan, Xing et al. 2013).

Nous rapportons également que la fréquence des lymphocytes T CD4 MCAM⁺ est plus élevée dans le sang et le LCR des patients atteints de SEP que chez les contrôles sains ou autres maladies neurologiques non inflammatoires. De surcroît, elle augmente de façon significative lors des poussées alors qu'elle diminue sous traitement DMT. Nous avons également observé que la proportion des lymphocytes T CD8 MCAM⁺ est quant à elle significativement plus élevée chez les patients SEP uniquement lors des poussées, dans le sang comme dans le LCR, et que l'utilisation de DMT tend à réduire la proportion de MCAM⁺CD8⁺ mémoire en circulation. MCAM étant un marqueur de surface préférentiellement exprimé par les lymphocytes mémoire (CD45RO), il est important de souligner que ces observations sont également valables lorsque la proportion de lymphocytes T CD4 et CD8 mémoire exprimant MCAM est analysée, indiquant donc un enrichissement spécifique des lymphocytes MCAM⁺ dans le sang et le LCR des patients atteints de SEP et non pas un simple enrichissement de la fraction CD45RO. De façon similaire, la fréquence de CD4⁺MCAM⁺ est augmentée dans le sang de patients atteints d'autres conditions inflammatoires comme la sarcoïdose, la maladie de Behçet, le syndrome de Sjögren secondaire, les maladies inflammatoires intestinales, l'arthrite rhumatoïde et chez certains patients atteints de psoriasis, mais pas en lupus érythémateux systémique ou en sclérose systémique, supportant le rôle de MCAM dans certaines conditions inflammatoires chroniques préférentiellement associées aux TH17 et à l'infiltration d'organes cibles par des lymphocytes T activés (Dagur, Tatlici et al. 2010, Dagur, Biancotto et al. 2011, Kamiyama, Watanabe et al. 2012, Hadjinicolaou, Wu et al. 2013). La proportion de CD8⁺MCAM⁺ est quant à elle augmentée dans le sang périphérique de façon modeste en syndrome de Sjögren secondaire, en

maladie de Behçet et en 'birdshot chorioretinopathy' (une forme d'uvéïte postérieure bilatérale) mais pas en arthrite rhumatoïde ou en sarcoïdose (Hadjinicolaou, Wu et al. 2013, Dagur, Biancotto et al. 2014). Les résultats obtenus chez les cas de Behçet et de 'birdshot chorioretinopathy' sont particulièrement intéressants étant donné qu'il s'agit de maladies auto-immunes pour lesquelles une prédisposition génétique liée au MHC classe I existe et qui sont associées à l'IL-17, tout comme la SEP, suggérant donc un rôle majeur des Tc17 dans certaines maladies inflammatoires auto-immunes. Des niveaux élevés de CD8⁺MCAM⁺ en psoriasis n'ont pas encore été rapportés mais seraient donc également attendus. L'augmentation prononcée de CD4⁺MCAM⁺ et de CD8⁺MCAM⁺ circulants lors des poussées de SEP est toutefois actuellement sans parallèle, les rapports concernant les autres maladies inflammatoires n'ayant pas rapporté l'expression de MCAM en fonction de l'activité de la maladie. Toutefois, l'expression de MCAM étant associée à l'expression d'IL-17, nos données reflètent donc l'augmentation de lymphocytes CD4 et CD8 produisant de l'IL-17 dans le sang et le LCR des patients en poussée (Matusevicius, Kivisakk et al. 1999, Brucklacher-Waldert, Stuermer et al. 2009, Durelli, Conti et al. 2009, Huber, Heink et al. 2013). L'expression de MCAM étant fortement associée avec l'expression de CD161, nos observations sont également appuyées par l'augmentation de CD8⁺CD161⁺ chez les patients atteints de SEP mais pas chez les patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Annibali, Ristori et al. 2011). La diminution de la proportion de CD8⁺MCAM⁺ après traitement est également en accord avec les études rapportant une diminution des CD8⁺CD161⁺ après traitement immunosuppresseur en SEP (Abrahamsson, Angelini et al. 2013). De plus, nos données *in situ* dans le SNC de patients SEP démontrent une infiltration de l'organe cible par les lymphocytes T CD4 et CD8 MCAM⁺ en SEP. Ces données sont compatibles avec la présence de lymphocytes CD161⁺ et IL-17⁺ rapportée préalablement dans les lésions SEP (Tzartos, Friese et al. 2008, Annibali, Ristori et al. 2011, Abrahamsson, Angelini et al. 2013) et avec l'enrichissement des CD3⁺MCAM⁺ infiltrant la peau en cas de dermatite, psoriasis et lichen plan ainsi que des CD4⁺MCAM⁺ et CD8⁺MCAM⁺ retrouvés dans le liquide synovial en arthrite rhumatoïde (Pickl, Majdic et al. 1997, Weninger, Rendl et al. 2000, Schon, Kahne et al. 2005, Dagur, Tatlici et al. 2010). L'intérêt d'étudier plus en profondeur l'utilité de l'expression de MCAM par les lymphocytes circulants comme reflet de l'activité de la maladie en SEP est donc clair. La confirmation de MCAM comme biomarqueur demandera

toutefois encore un travail considérable, nécessitant un suivi longitudinal pour confirmer sa variation chez un même individu en fonction de l'activité de la maladie, de l'initiation d'un traitement et de l'efficacité du traitement, suivi de la confirmation de ces résultats dans une cohorte indépendante. Ces travaux sont en cours dans le laboratoire du Dr Prat.

Il existe une forme soluble de MCAM, qui résulterait du clivage de la forme membranaire par les MMPs. Cette forme soluble de MCAM augmenterait la migration des monocytes à travers une couche de cellules dérivées de l'endothélium de veines ombilicales humaines (Bardin, Blot-Chabaud et al. 2009). Les niveaux de la forme soluble de MCAM seraient augmentés par le TNF (Bardin, Blot-Chabaud et al. 2009), dans le liquide synovial de patients atteints d'arthrite rhumatoïde (Neidhart, Wehrli et al. 1999), en insuffisance rénale chronique (Bolton, Downs et al. 2001, Ouhtit, Gaur et al. 2009), en myopathie inflammatoire (Figarella-Branger, Schleinitz et al. 2006) et selon Duan *et al.* dans le LCR de patients SEP en poussée (Duan, Luo et al. 2013). Au contraire, les niveaux de MCAM solubles seraient significativement diminués en maladie inflammatoire intestinale active (Bardin, Reumaux et al. 2006). Nos propres mesures dans le sérum et le sang de patients SEP en poussée ou non n'ont pas montré de différence significative en fonction de l'activité de la maladie ou par rapport aux autres maladies neurologiques bien que le nombre d'échantillons testés ait été modeste ($n = 12$, données non publiées). La discordance de nos observations avec celles du groupe de Duan *et al.* pourrait concorder avec l'utilisation de différents anticorps anti-MCAM pour l'ELISA et/ou avec la différence observée au niveau de la prévalence, la présentation clinique et le fond génétique entre les cohortes de patients SEP de descendance européenne et ceux de descendance asiatique. Il est par contre à noter que moins de 10% de leur cohorte de patients SEP dits inactifs présentaient des BOC (contre 78.3% BOC⁺ chez leurs patients SEP dits actifs), soulevant un grand doute quant au diagnostic de SEP et donc à la validité de leurs résultats (Duan, Luo et al. 2013). L'intérêt de la forme soluble de MCAM comme biomarqueur nous paraît donc plus limité mais nécessiterait des études plus approfondies pour conclure.

Nos données et celles de plusieurs autres groupes confirment l'association de MCAM avec l'expression d'IL-17 par les CD4 (Dagur, Biancotto et al. 2011, Flanagan, Fitzgerald et al. 2012, Kamiyama, Watanabe et al. 2012) et les données de Dagur *et al.* et les nôtres celle de

l'association de MCAM avec un phénotype Tc17 (Dagur, Biancotto et al. 2014). Nos données associant l'expression de MCAM par les lymphocytes T CD8 exprimant l'IFN- γ , le TNF et l'IL-17 sont également corroborées par des résultats similaires obtenus lors de l'analyse de CD8⁺CD161⁺ (Abrahamsson, Angelini et al. 2013). Nous démontrons en plus l'utilité de MCAM comme marqueur de surface stable des TH17, qui persiste après activation et permet de raffiner l'identification des producteurs d'IL-17 chez la population CCR6⁺CD161⁺. De plus, nous identifions MCAM comme un marqueur de CD4 et CD8 co-exprimant IL-17 et IFN- γ et exprimant GM-CSF et donc présentant un potentiel encéphalitogénique marqué (Kebir, Ifergan et al. 2009, Codarri, Gyulveszi et al. 2011, El-Behi, Ciric et al. 2011). Nous rapportons également une induction de MCAM plus prononcée en présence d'IL-23 (en combinaison avec le TGF- β et l'IL-6 lorsque la population de départ n'est pas constituée de cellules mémoire), ce qui renforce la notion de MCAM comme marqueur des sous-populations pathogéniques de CD4 et CD8 en SEP. En effet, il a été démontré que l'IL-23 est nécessaire pour le développement de TH17 capables d'induire une EAE sévère, de Tc17 associés à l'auto-immunité, de lymphocytes T capables d'infiltrer l'organe cible dans un modèle de colite et pour que les Tc17 soient pathogéniques dans un modèle de diabète (Ciric, El-behi et al. 2009, Ahern, Schiering et al. 2010, Ghoreschi, Laurence et al. 2010). Cette exposition à l'IL-23 favoriserait la production de GM-CSF chez les CD4 et les CD8, préférentiellement chez les lymphocytes MCAM⁺ selon nos observations. Les CD4⁺MCAM⁺ mémoire exprimant des niveaux plus élevés d'ARN pour l'IL-23R et la capacité à répondre à l'IL-23 étant confinée aux cellules exprimant CD161 chez les lymphocytes T CD8 mémoire, nos résultats démontrant la production plus marquée de GM-CSF par les CD4 et CD8 MCAM⁺ et l'expansion ou l'induction de CD4 et CD8 MCAM⁺ en présence d'IL-23 sont donc biologiquement plausibles (Shen, Zhang et al. 2013). Le GM-CSF est essentiel en EAE, participe au recrutement de cellules myéloïdes et augmente à son tour la production d'IL-23 par les APCs et la microglie, pouvant donc générer un circuit de renforcement en périphérie ou dans le SNC entre le GM-CSF produit par les lymphocytes T et l'IL-23 produit par les APCs et les microglies (Ponomarev, Shriver et al. 2007, Sonderegger, Iezzi et al. 2008, Codarri, Gyulveszi et al. 2011, El-Behi, Ciric et al. 2011). De plus, le GM-CSF augmenterait non seulement la production d'IL-23 mais également celle d'IL-6 par les cellules dendritiques et les macrophages (Sonderegger, Iezzi et al. 2008). Nos observations indiquent que l'induction

de MCAM sur les CD8 est également plus marquée en présence d'IL-6, qui serait nécessaire à la prolifération des lymphocytes T CD8 et à la différenciation de CD8 capables d'induire une colite inflammatoire dans certaines conditions (Tajima, Wakita et al. 2008). Nos données démontrent de plus que l'IL-15 favorise également le développement de CD8 MCAM⁺ lorsqu'ajouté aux conditions de polarisation Tc17 chez la souris, alors que l'IL-12 augmente l'expression de MCAM sur les CD8 humains et de façon synergique avec l'IL-23. De façon notable, l'IL-12 est associée à la prolifération des CD8⁺CD161⁺, à leur production d'IFN- γ et à l'acquisition de fonction cytotoxique par les Tc17 (Annibali, Ristori et al. 2011, Tajima, Wakita et al. 2011, Satoh, Tajima et al. 2012). L'IL-23, l'IL-12, l'IL-6 et l'IL-15 peuvent toutes être retrouvées à des niveaux plus élevés en périphérie ou dans le SNC des patients souffrant de SEP par comparaison aux contrôles sains, pouvant donc expliquer partiellement la fréquence accrue de lymphocytes MCAM⁺ retrouvée chez nos patients atteints de SEP (Navikas, Matusевич et al. 1996, Stelmasiak, Koziol-Montewka et al. 2001, van Boxel-Dezaire, Smits et al. 2001, Bartosik-Psujek and Stelmasiak 2005, Krakauer, Sorensen et al. 2008, Alexander, Harris et al. 2010, Saikali, Antel et al. 2010, Laroche, Alvarez et al. 2011, Schneider, Mohebiany et al. 2011, Tomioka and Matsui 2014).

Nos résultats concernant l'augmentation de l'activité lytique dirigée contre les oligodendrocytes des CD8 MCAM⁺ activés par rapport aux CD8 MCAM^{neg} activés peuvent sembler surprenants vu l'absence de corrélation entre l'expression de MCAM et celle des cytokines perforine et GzB *ex vivo*. Une étude a démontré que les Tc17 expriment GzB et sont cytolytiques, cependant l'exposition à l'IL-23 serait nécessaire à leur pathogénicité (Ciric, El-behi et al. 2009). Certaines études ont suggéré que les Tc17 n'exprimant pas l'IFN- γ présentent une faible capacité lytique (Annibali, Ristori et al. 2011, Tajima, Wakita et al. 2011, Dagur, Biancotto et al. 2014) alors que les Tc17/1 (co-exprimant IL-17 et IFN- γ après exposition à l'IL-12) présenteraient de hauts niveaux de perforine et GzB (Tajima, Wakita et al. 2011, Satoh, Tajima et al. 2012). De plus, l'activité anti-tumorale des Tc17 est liée à leur production d'IFN- γ et de TNF (Hinrichs, Kaiser et al. 2009, Garcia-Hernandez Mde, Hamada et al. 2010, Tajima, Wakita et al. 2011). La co-expression de l'IFN- γ et du TNF en plus de l'IL-17 tant *ex vivo* qu'*in vitro* que nous observons chez les CD8⁺MCAM⁺ suggère donc un potentiel d'activité lytique après activation, en particulier face aux oligodendrocytes. En effet,

l'IFN- γ induit l'expression de MHC classe I par les oligodendrocytes (Massa, Ozato et al. 1993) et endommage les oligodendrocytes (Horwitz, Evans et al. 1997). En contexte inflammatoire, les oligodendrocytes augmentent leur expression de MHC classe I, Fas, IFN- γ R et TNFR et sont donc des cibles pour les CD8 (Patel and Balabanov 2012). Nos données démontrent qu'en présence d'oligodendrocytes, les lymphocytes CD8 activés augmentent leur expression de MCAM et présentent une plus grande capacité à tuer les oligodendrocytes, associée à une plus grande expression du marqueur de dégranulation CD107a. En accord avec ces données, nous rapportons que l'activation *in vitro* semble induire l'expression de perforine et GzB préférentiellement chez les lymphocytes CD8 MCAM⁺. La réduction des scores de démyélinisation préalablement rapportée lors de l'utilisation d'un anticorps anti-MCAM en EAE pourrait supporter un rôle des lymphocytes MCAM⁺ dans la destruction de la myéline *in vivo* (Flanagan, Fitzgerald et al. 2012). Les mécanismes sous-tendant l'induction de MCAM sur les lymphocytes T CD8 après co-culture avec les oligodendrocytes et les mécanismes sous-tendant la mort des oligodendrocytes n'ont pas encore été étudiés en profondeur. L'expression de MCAM par les oligodendrocytes semble possible en culture primaire (données préliminaires non publiées) et est actuellement l'objet d'études par le laboratoire du Dr Arbour. De plus, nous avons généré des données préliminaires qui suggèrent une mort neuronale plus importante suite à l'exposition de neurones humains en culture primaire à des CD8 MCAM⁺ par rapport à l'exposition à des CD8 MCAM^{neg}. Les neurones peuvent induire des Treg fonctionnels (Liu, Teige et al. 2006) et n'expriment pas MHC classe I en condition physiologique. Toutefois, les neurones exposés à l'IFN- γ augmentent leur expression de MHC classe I et les neurones endommagés et ne présentant pas d'activité électrique expriment plus facilement MHC classe I en réponse aux cytokines inflammatoires (Friese and Fugger 2005). En EAE et *in vitro* suite à l'exposition aux CD8⁺MCAM⁺, les neurones ne sont donc probablement plus résistants aux lymphocytes T cytotoxiques. Nos données préliminaires demandent confirmation mais suggèrent un mécanisme pour expliquer l'amélioration des déficits neurologiques chroniques par la déplétion ou le blocage de MCAM en EAE. Par ailleurs, l'expression d'enzymes lytiques par les lymphocytes CD8 circulants est associée à une capacité suppressive des CD8 envers les CD4 (Abrahamsson, Angelini et al. 2013). Les CD8 MCAM⁺ n'exhibent pas de capacité suppressive lors de la co-culture avec les CD4, au

contraire nous avons observé qu'ils favorisent l'expression de TNF par les CD4 et diminuent celle de TGF- β et d'IL-4 (données non publiées).

Il a été précédemment démontré que MCAM est impliqué dans l'adhérence aux cellules endothéliales périphériques des clones TH17 mais pas des clones TH1 (Brucklacher-Waldert, Stuermer et al. 2009). En accord avec ces données, nous rapportons une diminution significative de la migration des TH17 et des CD8 à travers la BHE humaine dans un modèle *in vitro* utilisant uniquement des cellules humaines en culture primaire. Duan *et al.* ont par la suite confirmé que bloquer MCAM à l'aide d'un anticorps distinct du P1H12 ou inhiber son expression par 'small interfering RNA' (siRNA) réduit la transmigration des CD4 et des CD8 à travers un modèle *in vitro* de BHE humaine, utilisant dans leur cas une lignée de cellules endothéliales cérébrales humaines (Duan, Xing et al. 2013). Bardin *et al.* ayant précédemment démontré une réduction de la migration des monocytes à travers une mono-couche de cellules endothéliales périphériques en utilisant un anticorps anti-MCAM (Bardin, Blot-Chabaud et al. 2009), il serait intéressant de vérifier si la réduction de l'infiltration du SNC par les cellules exprimant le MHC classe II et le F4/80 que nous rapportons lors du traitement avec le Fc-MCAM en EAE est uniquement secondaire à une réduction de leur recrutement dans le SNC par les lymphocytes T MCAM⁺ sécrétant des chimiokines et cytokines ou si moduler MCAM au niveau de la BHE peut avoir un impact direct sur leur migration transendothéliale. De plus, puisque la forme soluble de MCAM serait augmentée en présence de TNF et par l'action des métalloprotéinases et faciliterait la migration transendothéliale des monocytes (Bardin, Blot-Chabaud et al. 2009), il est possible qu'une partie de la réduction de l'infiltration immunitaire du SNC lors de la déplétion des CD4 et/ou CD8 MCAM⁺ (qui expriment EMMPRIN et TNF) soit due à une réduction des niveaux de MCAM soluble, bien que cette forme de MCAM n'ait pas été étudiée en EAE. De futures études évaluant l'impact du MCAM soluble et celui d'un anticorps anti-MCAM sur le recrutement de populations leucocytaires autres que les CD4 et CD8 pouvant être impliquées en SEP (par exemple monocytes, lymphocytes B et granulocytes) permettrait de clarifier ce point et de mieux évaluer l'impact thérapeutique potentiel de la modulation MCAM. Puisque nous et d'autres groupes (Dagur, Biancotto et al. 2011, Flanagan, Fitzgerald et al. 2012, Dagur, Biancotto et al. 2014) rapportent que les lymphocytes MCAM⁺ expriment CCR6, ils seraient théoriquement avantagés pour entrer dans

le SNC via les plexus choroïdiens, et nous avons à ce sujet démontré qu'on les retrouve en plus grande proportion dans le LCR, en particulier chez les sujets atteints de SEP. Flanagan *et al.* ont par ailleurs démontré que le Fc-MCAM se lie à la laminine 411 et qu'un anticorps neutralisant les interactions MCAM/laminine 411 diminue l'adhérence des lymphocytes T sur la laminine 411 et la sévérité de l'EAE (Flanagan, Fitzgerald *et al.* 2012). La laminine 411 est exprimée au niveau des plexus choroïdiens et des veinules post-capillaires et favorise les infiltrats leucocytaires périvasculaires en EAE (Sixt, Engelhardt *et al.* 2001, Wu, Ivars *et al.* 2009). L'implication de l'entrée par les plexus choroïdiens et des interactions MCAM-laminine 411 au niveau de la BHE n'a pas été spécifiquement évaluée par notre équipe mais pourraient également participer à la réduction de l'infiltration du SNC lors de la déplétion des lymphocytes T CD4 ou CD8 exprimant MCAM ou lors de l'utilisation d'un anticorps anti-MCAM en EAE. Nous rapportons que les lymphocytes T MCAM⁺ expriment de plus hauts niveaux de CD147 (EMMPRIN) et peuvent donc activer les MMPs nécessaires à l'entrée dans le SNC à travers la *glia limitans vascularis*. Dans la même veine, l'expression de MCAM par les cellules de mélanome est associée à une augmentation de l'activité de MMPs alors que l'utilisation d'un anticorps anti-MCAM réduit l'induction de MMPs endothéliales par l'environnement tumoral (Mills, Tellez *et al.* 2002, Bu, Gao *et al.* 2006). La participation de l'expression d'EMMPRIN par les lymphocytes MCAM⁺ à leur entrée dans le SNC est toutefois uniquement spéculative et n'a pas été étudiée. L'impact de l'utilisation de l'anticorps anti-MCAM sur la production de MMPs par la BHE n'a pas non plus été étudié.

Il demeure à déterminer si la réduction de la migration lymphocytaire en présence d'un anticorps anti-MCAM dépend en partie de la neutralisation des interactions MCAM-MCAM ou uniquement des interactions du MCAM exprimé à la surface des leucocytes avec un ligand hétérogène exprimé par la BHE (laminine 411 ou autre) et vice-versa. L'absence d'impact de l'anticorps anti-MCAM sur la migration des CD4 activés MCAM^{neg} suggère l'importance du blocage de MCAM au niveau des lymphocytes T CD4 mais ne permet pas de déterminer si l'interaction avec la BHE est homotypique ou à travers un ligand hétérogène exprimé par la BHE, comme la laminine 411. Au contraire, bloquer MCAM à l'aide d'un anticorps différent, le AA98, diminuerait la transmigration leucocytaire uniquement lorsqu'appliqué sur l'endothélium et pas lorsque les lymphocytes sont pré-traités avant l'essai de migration (Duan,

Xing et al. 2013). Cette différence pourrait s'expliquer par l'utilisation d'un autre anticorps, qui possiblement reconnaît une région différente de MCAM impliquée dans les interactions avec un ligand spécifique différent ou dans le blocage de la signalisation intracellulaire, ou par l'usage de cellules *ex vivo* plutôt que TH17 ou activées. Par ailleurs, la réduction plus modeste mais significative de la migration des CD8 non activés (exprimant MCAM dans une faible proportion) que nous avons observée suggère l'importance de l'expression endothéliale de MCAM pour la transmigration des CD8. Toutefois, il est à noter que le contact avec les cellules endothéliales de la BHE *in vitro* augmente significativement et rapidement l'expression de MCAM à la surface des lymphocytes T CD8 adhérents. Ce phénomène, inchangé suite au blocage des MHC classe I endothéliaux, est également observé après contact avec des oligodendrocytes humains en culture primaire mais n'est pas observé en alloréaction avec des CD4 *ex vivo* (données non publiées). Il pourrait être associé à un échange de membrane avec les cellules endothéliales ou oligodendrocytaires exprimant MCAM (données non publiées) ou à l'activation de cellules présentant un pool intracytoplasmique de MCAM pouvant être rapidement transporté à la surface (Bardin, Blot-Chabaud et al. 2009). Il est également intéressant de noter que MCAM pourrait s'auto-induire via l'activation d'AKT dans des cellules de mélanome (Li, Kalabis et al. 2003).

Nos résultats *ex vivo*, *in vitro* et *in situ* chez l'humain suggèrent la possibilité de réduire la transmigration lymphocytaire à travers la BHE et donc possiblement la formation de lésions inflammatoires du SNC en SEP en bloquant MCAM. Nous avons vérifié cette hypothèse *in vivo* en utilisant différents modèles d'EAE, le modèle animal de SEP le plus répandu. Tout d'abord, nous avons confirmé que le patron d'expression de MCAM par les lymphocytes T CD4 et CD8 et par la BHE est similaire chez la souris en EAE à celui observé chez l'humain en SEP. L'expression de MCAM est effectivement faible chez la souris non immunisée mais augmente de façon considérable sur la BHE en EAE, en plus d'être associée à un phénotype mémoire TH1/TH17 et Tc1/Tc17 sur les lymphocytes T réactivés. Tout comme le groupe de Flanagan, nous avons pu démontrer une augmentation de l'expression de MCAM sur les lymphocytes réactivés en présence d'IL-23 (Flanagan, Fitzgerald et al. 2012). En administrant un traitement prophylactique de Fc-MCAM (avant le début des symptômes) en EAE active chez les souris C57Bl/6, nous avons pu démontrer que moduler MCAM *in vivo* permet de

réduire les symptômes neurologiques et la formation de lésions inflammatoires du SNC dans le modèle le plus classique d'EAE. De plus, en administrant un Fc-MCAM et un anticorps anti-MCAM après le début des symptômes neurologiques, nous avons démontré l'intérêt thérapeutique des anticorps ou bloquants anti-MCAM pour réduire le processus neuroinflammatoire, reproduisant chez les C57Bl/6 immunisées avec MOG₃₅₋₅₅ les trouvailles de Flanagan *et al.* chez les SJL immunisées avec le PLP (Flanagan, Fitzgerald et al. 2012). Ces résultats ont été confirmés par un groupe indépendant utilisant un anticorps anti-MCAM distinct (Duan, Xing et al. 2013). Par ailleurs, vu nos résultats concernant le rôle des lymphocytes CD8⁺MCAM⁺ dans la lyse oligodendrocytaire et possiblement neuronale, nous avons choisi d'évaluer l'impact d'un anticorps anti-MCAM sur la progression. Pour ce faire, nous avons utilisé les souris transgéniques TCR1640 mâles, un modèle d'EAE primaire progressive spontanée, qui présentent une grande proportion de CD8⁺MCAM⁺ en périphérie et dans le SNC. L'absence de progression à un score d'EAE de plus de 2.0 chez le groupe traitement suggère fortement un potentiel pour améliorer les formes progressives de SEP à travers la modulation de MCAM, ce qui présente un intérêt majeur en clinique vu l'absence de traitement disponible pour ces formes de SEP.

Une limitation importante des études en EAE est toutefois à souligner, en effet les leucocytes CD11b⁺ et les cellules NK peuvent exprimer MCAM chez la souris, alors que ce n'est pas le cas pour les sous-populations leucocytaires équivalentes chez l'humain. L'amélioration de l'EAE par les bloquants MCAM pourrait donc théoriquement résulter de l'impact de la neutralisation de MCAM sur les cellules NK et les CD11b⁺, et auquel cas ne reflèterait pas le potentiel thérapeutique chez l'humain. De plus, Duan *et al.* suggèrent dans leur modèle que l'expression de MCAM par la BHE plutôt que par les lymphocytes est primordiale en EAE (Duan, Xing et al. 2013). Afin d'isoler l'impact de l'expression de MCAM par les lymphocytes T CD4, nous avons donc effectué le transfert de CD4 réactivés totaux versus des CD4 réactivés déplétés de cellules MCAM⁺. L'amélioration clinique et pathologique des récipients de CD4⁺MCAM^{neg} par rapport aux récipients de CD4⁺MCAM⁺ a permis de confirmer le rôle majeur des CD4⁺MCAM⁺ en neuroinflammation et suggère un potentiel pour une stratégie d'anticorps anti-MCAM déplétant cette population, à l'image du rituximab causant une déplétion des lymphocytes B CD20⁺.

L'isolation du rôle des lymphocytes T CD8 exprimant MCAM était plus difficile à réaliser. En effet, le modèle EAE étant basé sur la présentation d'un antigène de myéline par un MHC classe II, la participation des CD8 est probablement sous-estimée et plus difficilement mise en lumière. Par exemple, des études récentes démontrent que lors du transfert d'EAE par des CD4 porteurs d'un TCR transgénique spécifique pour un peptide de myéline et réactivés *in vitro*, la participation des CD8 et/ou des lymphocytes B n'est pas nécessaire (Anderson, Chandwaskar et al. 2012, Huber, Heink et al. 2013, Leuenberger, Paterka et al. 2013). Toutefois, il est peu probable que cela reflète le processus réel impliqué dans la formation de lésions en SEP, particulièrement en regard de l'absence d'amélioration de la maladie par la déplétion de CD4 (van Oosten, Lai et al. 1997) et l'efficacité démontrée de la déplétion de lymphocytes B pour supprimer l'activité clinique et radiologique en SEP (Hauser, Waubant et al. 2008, Kappos, Li et al. 2011). D'un autre côté, dans les modèles d'EAE où les CD4 spécifiques pour la myéline sont moins nombreux ou même absents (Huseby 2001, Sun 2001, Anderson 2012), le potentiel pro-inflammatoire et encéphalitogénique des lymphocytes T CD8⁺ activés est mis en évidence, en particulier celui des Tc17 (Huseby, Liggitt et al. 2001, Sun, Whitaker et al. 2001, Anderson, Chandwaskar et al. 2012, Huber, Heink et al. 2013). En général, les lymphocytes T CD8 nécessitent toutefois la présence d'un certain nombre de CD4 pour pouvoir infiltrer l'organe cible dans les processus inflammatoires auto-immuns comme l'EAE ou le diabète (Saxena, Desbois et al. 2012, Huber, Heink et al. 2013). Nous avons donc opté pour le co-transfert d'un nombre sous-optimal de lymphocytes T CD4 réactivés totaux avec des lymphocytes T CD8 réactivés déplétés ou non des cellules MCAM⁺ afin de déterminer la contribution des CD8 MCAM⁺ en EAE. La déplétion de MCAM dans le compartiment CD8 a diminué la sévérité de l'EAE chez les récipients, suggérant un rôle pathogénique des CD8⁺MCAM⁺ en EAE. Nos données sont en accord avec celles de Huber *et al.* qui ont démontré une augmentation de la sévérité de l'EAE en présence de Tc17 (Huber, Heink et al. 2013). Il est à noter que bien que l'administration de l'anticorps MCAM et du Fc-MCAM ou la déplétion des lymphocytes MCAM⁺ n'aient pas changé la prolifération leucocytaire et l'expression de cytokines en périphérie en EAE et que ceci soit appuyé par nos données *in vitro* chez l'humain (données non publiées) et par les données de Duan *et al.*, Huber *et al.* de leur côté rapportent une diminution de l'expression de l'IL-17 par les CD4 après co-culture avec des CD8 déficients en IL-17 (Duan, Xing et al. 2013, Huber, Heink et al.

2013). Il serait donc nécessaire dans le futur d'évaluer spécifiquement l'interaction des CD8⁺MCAM⁺ avec les CD4⁺MCAM⁺ plus en détail.

En plus de celles déjà mentionnées, il existe plusieurs limitations supplémentaires aux résultats rapportés ici. Premièrement, MCAM peut entraîner une signalisation intracellulaire, induisant la phosphorylation de nombreuses protéines, la redistribution d'actine, de paxiline et de cavéoline ainsi qu'une augmentation du calcium intracellulaire (Anfosso, Bardin et al. 1998, Anfosso, Bardin et al. 2001, Solovey, Gui et al. 2001). L'impact sur la signalisation intracellulaire des diverses stratégies utilisées dans ce projet pour neutraliser ou dépléter MCAM *in vitro* et en EAE n'a pas été étudié et pourrait permettre de mieux comprendre le rôle de MCAM dans les processus neuroinflammatoires, très vraisemblablement un rôle complexe et non pas limité à un marqueur de surface des TH17/1 et Tc17/1 et une molécule d'adhérence utilisée pour transmigration à travers la BHE. De plus, MCAM serait impliqué dans la résistance à l'apoptose des cellules de mélanome à travers l'inhibition de BAD par la phosphorylation et l'activation d'AKT (Li, Kalabis et al. 2003). La résistance à l'apoptose des cellules endothéliales ou des lymphocytes exprimant MCAM n'a pas été testée, bien que cette dernière puisse être impliquée dans la capacité à envahir le SNC. En effet, les cellules résidentes du SNC peuvent normalement induire l'apoptose des cellules T activées afin de se protéger de l'attaque immunitaire (Na, Hermann et al. 2012, Gimsa, Mitchison et al. 2013).

À l'inverse, les mécanismes exacts sous-tendant l'induction de MCAM par l'activation non spécifique et par certaines cytokines spécifiques n'ont pas non plus été élucidés. L'augmentation de l'expression de MCAM par des cellules endothéliales exposées à un milieu hyperglycémique suggère que certains facteurs environnementaux peuvent influencer l'expression de MCAM (Chettab, Zibara et al. 2002). Il serait donc intéressant de déterminer l'impact de certains facteurs environnementaux associés au risque de développer la SEP, par exemple le sodium, la vitamine D et les œstrogènes, sur l'expression de MCAM par l'endothélium de la BHE et par les lymphocytes, *in vitro* et dans le sang périphérique de sujets sains et SEP.

MCAM est également impliqué dans l'angiogénèse induite par le VEGF et dans l'induction d'ICAM-1 par l'environnement tumoral (Bu, Gao et al. 2006, Jiang, Zhuang et al. 2012). De plus, le traitement de mono-couches de cellules endothéliales avec des anticorps

anti-MCAM a causé une augmentation de leur perméabilité en condition non inflammatoire. En condition inflammatoire, lorsque la perméabilité est déjà augmentée, le traitement avec un anticorps anti-MCAM n'influence pas la perméabilité des mono-couches de cellules endothéliales. Dans les deux cas, il est toutefois à noter que l'anticorps anti-MCAM réduit quand même la transmigration leucocytaire (Solovey, Gui et al. 2001, Bardin, Blot-Chabaud et al. 2009). L'impact de l'utilisation chronique d'anticorps anti-MCAM sur l'angiogénèse et la perméabilité vasculaire, en particulier au niveau de la BHE, sera à évaluer avant de pouvoir juger du risque associé à son utilisation et pour affirmer son intérêt en clinique pour réduire l'infiltration du SNC par les cellules immunitaires en SEP.

Finalement, dans les deux dernières années, deux autres ligands hétérophiliques de MCAM ont été identifiés, mais leur interaction avec MCAM en SEP et en EAE n'a pas été caractérisée. Le premier ligand est galectine-1, un facteur qui induirait l'apoptose des cellules endothéliales de façon plus marquée en l'absence de MCAM (Jouve, Despoix et al. 2013). Lorsque sécrété par les cellules endothéliales en condition inflammatoire, galectine-1 pourrait induire l'apoptose des lymphocytes activés, toutefois l'impact de l'expression de MCAM par ces lymphocytes n'a pas été étudié (Perillo, Pace et al. 1995). En EAE, galectine-1 semble plutôt protecteur, toutefois son rôle en tant que ligand de MCAM n'a pas été étudié en neuroinflammation (Wang, Lu et al. 2009, Starossom, Mascanfroni et al. 2012). Le deuxième ligand de MCAM nouvellement identifié est Wnt5a, associé à la voie non canonique de signalisation des Wnt. L'interaction de Wnt5a avec MCAM serait impliquée dans la régulation de la migration de cellules dérivées de l'endothélium de veines ombilicales humaines (Ye, Zhang et al. 2013). Wnt5a est exprimé par certains neurones et pourrait augmenter leur production de NO, leur susceptibilité à la toxicité du peptide β -amyloïde et le développement de douleur chronique en EAE (Li, Zhong et al. 2011, Yuan, Shi et al. 2012, Munoz, Godoy et al. 2014). Par ailleurs certains neurones corticaux peuvent également exprimer MCAM (Tu, Gao et al. 2013). L'implication de MCAM dans les interactions entre les cellules du SNC (neurones et oligodendrocytes) et les lymphocytes T activés (TH17 et Tc17) constitue une portion de mon projet de post-doctorat.

Conclusion

Il existe probablement plusieurs sous-populations leucocytaires pathogéniques en SEP. Cibler uniquement les CD4 n'améliore pas la maladie, alors que cibler plusieurs populations lymphocytaires comme avec l'anti-CD52 ou la chimiothérapie ablative avec greffe de moelle osseuse est efficace mais peut augmenter l'auto-immunité, les néoplasies et les infections. Cibler de façon large les lymphocytes B est valable mais se complique d'infections du SNC comme avec l'utilisation du natalizumab. Il semble par ailleurs clair que les lymphocytes TH1 et les lymphocytes TH17 peuvent tous deux jouer un rôle en SEP, tout comme certaines populations de lymphocytes T CD8. Dans la même veine, cibler une seule cytokine a été peu fructueux en clinique, l'anti-TNF et l'IFN- γ empirant la SEP et l'anti-IL-17 ayant encore à être démontré efficace. En EAE, outre le GM-CSF, aucune cytokine dite pro-inflammatoire produite par les lymphocytes T n'est essentielle, bien que toutes celles associées aux TH1 et TH17 aient des impacts délétères potentiels. Cibler MCAM permettrait de toucher directement à la fois les lymphocytes TH17/1 et les lymphocytes Tc17/1. Bien que n'ayant pas été étudiés dans le cadre de ce projet de doctorat vu leur nombre négligeable *ex vivo*, il est à noter que des lymphocytes B MCAM⁺ peuvent être retrouvés en proportion importante suite à l'activation *in vitro* (données non publiées du Dr Romain Cayrol et (Elshal, Khan et al. 2005)). Dépléter ou neutraliser MCAM pourrait donc théoriquement toucher les sous-populations pathogéniques (ou à tout le moins activées) des 3 grands groupes lymphocytaires incriminés en SEP (CD4, CD8 et B). De plus, dépléter les lymphocytes MCAM⁺ et restreindre leur entrée dans le SNC permettrait de diminuer les niveaux de plusieurs cytokines pro-inflammatoires simultanément, en périphérie et dans le SNC, diminuant le recrutement de leucocytes au SNC sans toutefois neutraliser entièrement une de ces cytokines ni affecter une proportion considérable des lymphocytes T hors des poussées. L'utilisation d'un anticorps anti-MCAM ou d'un Fc-MCAM n'a pas démontré d'impact significatif sur la prolifération ou l'activation des cellules périphériques *in vitro* et *in vivo*, laissant présager une préservation des capacités de défense immunitaire systémique. L'intérêt de MCAM comme cible thérapeutique est appuyé par les données obtenues chez 3 modèles différents d'EAE, par 3 groupes indépendants et à l'aide de deux anticorps neutralisants distincts, d'un Fc-MCAM, d'une stratégie de déplétion et d'un

modèle de souris déficientes en MCAM sur leur BHE. Il est à noter que de façon consistante, l'utilisation d'un bloqueur MCAM semble diminuer les déficits neurologiques chroniques plus que les déficits aigus. Chez l'humain, bien que l'augmentation de l'expression de MCAM soit observée en parallèle à l'activité clinique et/ou radiologique et que des lymphocytes T MCAM⁺ soient retrouvés dans les lésions SEP, le véritable potentiel de MCAM comme biomarqueur demeure à confirmer. De plus, bien que les données recueillies dans ce travail et par d'autres groupes soulignent l'intérêt majeur de MCAM comme cible de traitement en SEP, l'effet thérapeutique en particulier sur la progression et le profil d'effets secondaires d'un traitement anti-MCAM chez les patients SEP demeure à démontrer. Des études de phase I avec des anticorps monoclonaux anti-MCAM humains étant en cours dans le cadre d'autres maladies inflammatoires associées aux TH17 comme le psoriasis, l'évaluation du potentiel de ces anticorps en SEP à court terme est toutefois envisageable.

Bibliographie

(1993). "Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. I. Clinical results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. The IFNB Multiple Sclerosis Study Group." Neurology **43**(4): 655-661.

Abbott, N. J., A. A. Patabendige, D. E. Dolman, S. R. Yusof and D. J. Begley (2010). "Structure and function of the blood-brain barrier." Neurobiol Dis **37**(1): 13-25.

Abbott, N. J., L. Ronnback and E. Hansson (2006). "Astrocyte-endothelial interactions at the blood-brain barrier." Nat Rev Neurosci **7**(1): 41-53.

Abrahamsson, S. V., D. F. Angelini, A. N. Dubinsky, E. Morel, U. Oh, J. L. Jones, D. Carassiti, R. Reynolds, M. Salvetti, P. A. Calabresi, A. J. Coles, L. Battistini, R. Martin, R. K. Burt and P. A. Muraro (2013). "Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis." Brain **136**(Pt 9): 2888-2903.

Acheson, E. D., C. A. Bachrach and F. M. Wright (1960). "Some comments on the relationship of the distribution of multiple sclerosis to latitude, solar radiation, and other variables." Acta Psychiatr Scand Suppl **35**(147): 132-147.

Agius, M., X. Meng, P. Chin, A. Grinspan and R. Hashmonay (2014). "Fingolimod Therapy in Early Multiple Sclerosis: An Efficacy Analysis of the TRANSFORMS and FREEDOMS Studies by Time Since First Symptom." CNS Neurosci Ther.

Agrawal, S., P. Anderson, M. Durbeej, N. van Rooijen, F. Ivars, G. Opdenakker and L. M. Sorokin (2006). "Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **203**(4): 1007-1019.

Agrawal, S. M., L. Lau and V. W. Yong (2008). "MMPs in the central nervous system: where the good guys go bad." Semin Cell Dev Biol **19**(1): 42-51.

Agrawal, S. M., C. Silva, W. W. Tourtellotte and V. W. Yong (2011). "EMMPRIN: a novel regulator of leukocyte transmigration into the CNS in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neurosci **31**(2): 669-677.

Agrawal, S. M., C. Silva, J. Wang, J. P. Tong and V. W. Yong (2012). "A novel anti-EMMPRIN function-blocking antibody reduces T cell proliferation and neurotoxicity: relevance to multiple sclerosis." J Neuroinflammation **9**: 64.

Agrawal, S. M. and V. W. Yong (2011). "The many faces of EMMPRIN - roles in neuroinflammation." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 213-219.

- Ahern, P. P., C. Schiering, S. Buonocore, M. J. McGeachy, D. J. Cua, K. J. Maloy and F. Powrie (2010). "Interleukin-23 drives intestinal inflammation through direct activity on T cells." Immunity **33**(2): 279-288.
- Alcaide, P., E. Maganto-Garcia, G. Newton, R. Travers, K. J. Croce, D. X. Bu, F. W. Luscinskas and A. H. Lichtman (2012). "Difference in Th1 and Th17 lymphocyte adhesion to endothelium." J Immunol **188**(3): 1421-1430.
- Alexander, J. S., M. K. Harris, S. R. Wells, G. Mills, K. Chalamidas, V. C. Ganta, J. McGee, M. H. Jennings, E. Gonzalez-Toledo and A. Minagar (2010). "Alterations in serum MMP-8, MMP-9, IL-12p40 and IL-23 in multiple sclerosis patients treated with interferon-beta1b." Mult Scler **16**(7): 801-809.
- Alikhani, M., S. Roy and D. T. Graves (2010). "FOXO1 plays an essential role in apoptosis of retinal pericytes." Mol Vis **16**: 408-415.
- Alvarez, J. I., R. Cayrol and A. Prat (2011). "Disruption of central nervous system barriers in multiple sclerosis." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 252-264.
- Alvarez, J. I., A. Dodelet-Devillers, H. Kebir, I. Ifergan, P. J. Fabre, S. Terouz, M. Sabbagh, K. Wosik, L. Bourbonniere, M. Bernard, J. van Horssen, H. E. de Vries, F. Charron and A. Prat (2011). "The Hedgehog pathway promotes blood-brain barrier integrity and CNS immune quiescence." Science **334**(6063): 1727-1731.
- Alvarez, J. I., T. Katayama and A. Prat (2013). "Glial influence on the blood brain barrier." Glia **61**(12): 1939-1958.
- Alvarez, J. I. and J. M. Teale (2008). "Multiple expression of matrix metalloproteinases in murine neurocysticercosis: Implications for leukocyte migration through multiple central nervous system barriers." Brain Res **1214**: 145-158.
- Anderson, A. C., R. Chandwaskar, D. H. Lee, J. M. Sullivan, A. Solomon, R. Rodriguez-Manzanet, B. Greve, R. A. Sobel and V. K. Kuchroo (2012). "A transgenic model of central nervous system autoimmunity mediated by CD4+ and CD8+ T and B cells." J Immunol **188**(5): 2084-2092.
- Anfosso, F., N. Bardin, V. Frances, E. Vivier, L. Camoin-Jau, J. Sampol and F. Dignat-George (1998). "Activation of human endothelial cells via S-endo-1 antigen (CD146) stimulates the tyrosine phosphorylation of focal adhesion kinase p125(FAK)." J Biol Chem **273**(41): 26852-26856.
- Anfosso, F., N. Bardin, E. Vivier, F. Sabatier, J. Sampol and F. Dignat-George (2001). "Outside-in signaling pathway linked to CD146 engagement in human endothelial cells." J Biol Chem **276**(2): 1564-1569.

Annibaldi, V., G. Ristori, D. F. Angelini, B. Serafini, R. Mechelli, S. Cannoni, S. Romano, A. Paolillo, H. Abderrahim, A. Diamantini, G. Borsellino, F. Aloisi, L. Battistini and M. Salvetti (2011). "CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis." Brain **134**(Pt 2): 542-554.

Annunziato, F., L. Cosmi, F. Liotta, E. Maggi and S. Romagnani (2012). "Defining the human T helper 17 cell phenotype." Trends Immunol **33**(10): 505-512.

Antel, J., S. Antel, Z. Caramanos, D. L. Arnold and T. Kuhlmann (2012). "Primary progressive multiple sclerosis: part of the MS disease spectrum or separate disease entity?" Acta Neuropathol **123**(5): 627-638.

Armulik, A., G. Genove and C. Betsholtz (2011). "Pericytes: developmental, physiological, and pathological perspectives, problems, and promises." Dev Cell **21**(2): 193-215.

Armulik, A., G. Genove, M. Mae, M. H. Nisancioglu, E. Wallgard, C. Niaudet, L. He, J. Norlin, P. Lindblom, K. Strittmatter, B. R. Johansson and C. Betsholtz (2010). "Pericytes regulate the blood-brain barrier." Nature **468**(7323): 557-561.

Armulik, A., M. Mae and C. Betsholtz (2011). "Pericytes and the blood-brain barrier: recent advances and implications for the delivery of CNS therapy." Ther Deliv **2**(4): 419-422.

Asadollahi, S., M. Fakhri, K. Heidari, A. Zandieh, R. Vafae and B. Mansouri (2013). "Cigarette smoking and associated risk of multiple sclerosis in the Iranian population." J Clin Neurosci **20**(12): 1747-1750.

Babbe, H., A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friese, R. Schroder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid and K. Rajewsky (2000). "Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction." J Exp Med **192**(3): 393-404.

Balabanov, R., T. Beaumont and P. Dore-Duffy (1999). "Role of central nervous system microvascular pericytes in activation of antigen-primed splenic T-lymphocytes." J Neurosci Res **55**(5): 578-587.

Balabanov, R., K. Strand, R. Goswami, E. McMahon, W. Begolka, S. D. Miller and B. Popko (2007). "Interferon-gamma-oligodendrocyte interactions in the regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neurosci **27**(8): 2013-2024.

Balabanov, R., K. Strand, A. Kemper, J. Y. Lee and B. Popko (2006). "Suppressor of cytokine signaling 1 expression protects oligodendrocytes from the deleterious effects of interferon-gamma." J Neurosci **26**(19): 5143-5152.

Banwell, B., A. Bar-Or, D. L. Arnold, D. Sadovnick, S. Narayanan, M. McGowan, J. O'Mahony, S. Magalhaes, H. Hanwell, R. Vieth, R. Tellier, T. Vincent, G. Disanto, G. Ebers, K. Wambara, M. B. Connolly, J. Yager, J. K. Mah, F. Booth, G. Sebire, D. Callen, B. Meaney,

M. E. Dilenge, A. Lortie, D. Pohl, A. Doja, S. Venketaswaran, S. Levin, E. A. Macdonald, D. Meek, E. Wood, N. Lowry, D. Buckley, C. Yim, M. Awuku, P. Cooper, F. Grand'maison, J. B. Baird, V. Bhan and R. A. Marrie (2011). "Clinical, environmental, and genetic determinants of multiple sclerosis in children with acute demyelination: a prospective national cohort study." Lancet Neurol **10**(5): 436-445.

Bardin, N., F. Anfosso, J. M. Masse, E. Cramer, F. Sabatier, A. Le Bivic, J. Sampol and F. Dignat-George (2001). "Identification of CD146 as a component of the endothelial junction involved in the control of cell-cell cohesion." Blood **98**(13): 3677-3684.

Bardin, N., M. Blot-Chabaud, N. Despoix, A. Kebir, K. Harhour, J. P. Arsanto, L. Espinosa, P. Perrin, S. Robert, F. Vely, F. Sabatier, A. Le Bivic, G. Kaplanski, J. Sampol and F. Dignat-George (2009). "CD146 and its soluble form regulate monocyte transendothelial migration." Arterioscler Thromb Vasc Biol **29**(5): 746-753.

Bardin, N., V. Frances, V. Combes, J. Sampol and F. Dignat-George (1998). "CD146: biosynthesis and production of a soluble form in human cultured endothelial cells." FEBS Lett **421**(1): 12-14.

Bardin, N., V. Frances, G. Lesaulle, N. Horschowski, F. George and J. Sampol (1996). "Identification of the S-Endo 1 endothelial-associated antigen." Biochem Biophys Res Commun **218**(1): 210-216.

Bardin, N., D. Reumaux, K. Geboes, J. F. Colombel, M. Blot-Chabaud, J. Sampol, P. Duthilleul and F. Dignat-George (2006). "Increased expression of CD146, a new marker of the endothelial junction in active inflammatory bowel disease." Inflamm Bowel Dis **12**(1): 16-21.

Barkhof, F., M. Filippi, D. H. Miller, P. Scheltens, A. Campi, C. H. Polman, G. Comi, H. J. Ader, N. Losseff and J. Valk (1997). "Comparison of MRI criteria at first presentation to predict conversion to clinically definite multiple sclerosis." Brain **120** (Pt 11): 2059-2069.

Barnes, P. J. (2001). "Th2 cytokines and asthma: an introduction." Respir Res **2**(2): 64-65.

Bartosik-Psujek, H. and Z. Stelmasiak (2005). "Correlations between IL-4, IL-12 levels and CCL2, CCL5 levels in serum and cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients." J Neural Transm **112**(6): 797-803.

Beauvillain, C., S. Donnou, U. Jarry, M. Scotet, H. Gascan, Y. Delneste, P. Guermonprez, P. Jeannin and D. Couez (2008). "Neonatal and adult microglia cross-present exogenous antigens." Glia **56**(1): 69-77.

Bechmann, I., I. Galea and V. H. Perry (2007). "What is the blood-brain barrier (not)?" Trends Immunol **28**(1): 5-11.

- Beer, S., K. M. Rosler and C. W. Hess (1995). "Diagnostic value of paraclinical tests in multiple sclerosis: relative sensitivities and specificities for reclassification according to the Poser committee criteria." J Neurol Neurosurg Psychiatry **59**(2): 152-159.
- Berer, K., M. Mues, M. Koutrolos, Z. A. Rasbi, M. Boziki, C. Johner, H. Wekerle and G. Krishnamoorthy (2011). "Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination." Nature **479**(7374): 538-541.
- Bettelli, E., M. Pagany, H. L. Weiner, C. Linington, R. A. Sobel and V. K. Kuchroo (2003). "Myelin oligodendrocyte glycoprotein-specific T cell receptor transgenic mice develop spontaneous autoimmune optic neuritis." J Exp Med **197**(9): 1073-1081.
- Bhat, R. and L. Steinman (2009). "Innate and adaptive autoimmunity directed to the central nervous system." Neuron **64**(1): 123-132.
- Biddison, W. E., D. D. Taub, W. W. Cruikshank, D. M. Center, E. W. Connor and K. Honma (1997). "Chemokine and matrix metalloproteinase secretion by myelin proteolipid protein-specific CD8+ T cells: potential roles in inflammation." J Immunol **158**(7): 3046-3053.
- Biegler, B. W., S. X. Yan, S. B. Ortega, D. K. Tennakoon, M. K. Racke and N. J. Karandikar (2006). "Glatiramer acetate (GA) therapy induces a focused, oligoclonal CD8+ T-cell repertoire in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **180**(1-2): 159-171.
- Bitsch, A., J. Schuchardt, S. Bunkowski, T. Kuhlmann and W. Bruck (2000). "Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation." Brain **123** (Pt 6): 1174-1183.
- Bolton, C. H., L. G. Downs, J. G. Victory, J. F. Dwight, C. R. Tomson, M. I. Mackness and J. H. Pinkney (2001). "Endothelial dysfunction in chronic renal failure: roles of lipoprotein oxidation and pro-inflammatory cytokines." Nephrol Dial Transplant **16**(6): 1189-1197.
- Bove, R. and T. Chitnis (2014). "The role of gender and sex hormones in determining the onset and outcome of multiple sclerosis." Mult Scler **20**(5): 520-526.
- Bove, R., A. Musallam, B. Healy, K. Raghavan, B. Glanz, R. Bakshi, H. Weiner, P. De Jager, K. Miller and T. Chitnis (2014). "Low testosterone is associated with disability in men with multiple sclerosis." Mult Scler.
- Bradl, M. and H. Lassmann (2010). "Oligodendrocytes: biology and pathology." Acta Neuropathol **119**(1): 37-53.
- Braley, T. J. and R. D. Chervin (2010). "Fatigue in multiple sclerosis: mechanisms, evaluation, and treatment." Sleep **33**(8): 1061-1067.
- Brightman, M. W. and T. S. Reese (1969). "Junctions between intimately apposed cell membranes in the vertebrate brain." J Cell Biol **40**(3): 648-677.

Brosnan, C. F. and C. S. Raine (2013). "The astrocyte in multiple sclerosis revisited." Glia **61**(4): 453-465.

Bruck, W., A. Bitsch, H. Kolenda, Y. Bruck, M. Stiefel and H. Lassmann (1997). "Inflammatory central nervous system demyelination: correlation of magnetic resonance imaging findings with lesion pathology." Ann Neurol **42**(5): 783-793.

Brucklacher-Waldert, V., K. Stuerner, M. Kolster, J. Wolthausen and E. Tolosa (2009). "Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis." Brain **132**(Pt 12): 3329-3341.

Bruno, R., L. Sabater, M. Sospedra, X. Ferrer-Francesch, D. Escudero, E. Martinez-Caceres and R. Pujol-Borrell (2002). "Multiple sclerosis candidate autoantigens except myelin oligodendrocyte glycoprotein are transcribed in human thymus." Eur J Immunol **32**(10): 2737-2747.

Bu, P., L. Gao, J. Zhuang, J. Feng, D. Yang and X. Yan (2006). "Anti-CD146 monoclonal antibody AA98 inhibits angiogenesis via suppression of nuclear factor-kappaB activation." Mol Cancer Ther **5**(11): 2872-2878.

Calabresi, P. A., E. W. Radue, D. Goodin, D. Jeffery, K. W. Rammohan, A. T. Reder, T. Vollmer, M. A. Agius, L. Kappos, T. Stites, B. Li, L. Cappiello, P. von Rosenstiel and F. D. Lublin (2014). "Safety and efficacy of fingolimod in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis (FREEDOMS II): a double-blind, randomised, placebo-controlled, phase 3 trial." Lancet Neurol.

Calzascia, T., F. Masson, W. Di Bernardino-Besson, E. Contassot, R. Wilmotte, M. Aurrand-Lions, C. Ruegg, P. Y. Dietrich and P. R. Walker (2005). "Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs." Immunity **22**(2): 175-184.

Carson, K. R., D. Focosi, E. O. Major, M. Petrini, E. A. Richey, D. P. West and C. L. Bennett (2009). "Monoclonal antibody-associated progressive multifocal leucoencephalopathy in patients treated with rituximab, natalizumab, and efalizumab: a Review from the Research on Adverse Drug Events and Reports (RADAR) Project." Lancet Oncol **10**(8): 816-824.

Carvalho-Tavares, J., M. J. Hickey, J. Hutchison, J. Michaud, I. T. Sutcliffe and P. Kubes (2000). "A role for platelets and endothelial selectins in tumor necrosis factor-alpha-induced leukocyte recruitment in the brain microvasculature." Circ Res **87**(12): 1141-1148.

Cayrol, R., K. Wosik, J. L. Berard, A. Dodelet-Devillers, I. Ifergan, H. Kebir, A. S. Haqqani, K. Kreyborg, S. Krug, R. Moudjian, A. Bouthillier, B. Becher, N. Arbour, S. David, D. Stanimirovic and A. Prat (2008). "Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system." Nat Immunol **9**(2): 137-145.

- Chang, J. H., H. R. Cha, D. S. Lee, K. Y. Seo and M. N. Kweon (2010). "1,25-Dihydroxyvitamin D3 inhibits the differentiation and migration of T(H)17 cells to protect against experimental autoimmune encephalomyelitis." PLoS One **5**(9): e12925.
- Charcot, J. (1868). "Histologie de la sclérose en plaques." Gazette des hospitaux de Paris **41**: 554-555.
- Chettab, K., K. Zibara, S. R. Belaiba and J. L. McGregor (2002). "Acute hyperglycaemia induces changes in the transcription levels of 4 major genes in human endothelial cells: macroarrays-based expression analysis." Thromb Haemost **87**(1): 141-148.
- Chu, C. Q., S. Wittmer and D. K. Dalton (2000). "Failure to suppress the expansion of the activated CD4 T cell population in interferon gamma-deficient mice leads to exacerbation of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Exp Med **192**(1): 123-128.
- Chui, R. and K. Dorovini-Zis (2010). "Regulation of CCL2 and CCL3 expression in human brain endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide." J Neuroinflammation **7**: 1.
- Ciric, B., M. El-behi, R. Cabrera, G. X. Zhang and A. Rostami (2009). "IL-23 drives pathogenic IL-17-producing CD8+ T cells." J Immunol **182**(9): 5296-5305.
- Codarri, L., G. Gyulveszi, V. Tosevski, L. Hesske, A. Fontana, L. Magnenat, T. Suter and B. Becher (2011). "RORgammat drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation." Nat Immunol.
- Confavreux, C., M. Hutchinson, M. M. Hours, P. Cortinavis-Tourniaire and T. Moreau (1998). "Rate of pregnancy-related relapse in multiple sclerosis. Pregnancy in Multiple Sclerosis Group." N Engl J Med **339**(5): 285-291.
- Correale, J. and M. Farez (2007). "Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis." Ann Neurol **61**(2): 97-108.
- Correale, J., M. Farez and G. Razzitte (2008). "Helminth infections associated with multiple sclerosis induce regulatory B cells." Ann Neurol **64**(2): 187-199.
- Correale, J. and M. F. Farez (2011). "The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis." J Neuroimmunol **233**(1-2): 6-11.
- Correale, J. and A. Villa (2010). "Role of CD8+ CD25+ Foxp3+ regulatory T cells in multiple sclerosis." Ann Neurol **67**(5): 625-638.
- Correale, J., M. C. Ysraelit and M. I. Gaitan (2009). "Immunomodulatory effects of Vitamin D in multiple sclerosis." Brain **132**(Pt 5): 1146-1160.

Correale, J., M. C. Ysraelit and M. I. Gaitan (2010). "Gender differences in 1,25 dihydroxyvitamin D3 immunomodulatory effects in multiple sclerosis patients and healthy subjects." J Immunol **185**(8): 4948-4958.

Cosmi, L., R. De Palma, V. Santarlasci, L. Maggi, M. Capone, F. Frosali, G. Rodolico, V. Querci, G. Abbate, R. Angeli, L. Berrino, M. Fambrini, M. Caproni, F. Tonelli, E. Lazzeri, P. Parronchi, F. Liotta, E. Maggi, S. Romagnani and F. Annunziato (2008). "Human interleukin 17-producing cells originate from a CD161+CD4+ T cell precursor." J Exp Med **205**(8): 1903-1916.

Cua, D. J., J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein and J. D. Sedgwick (2003). "Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain." Nature **421**(6924): 744-748.

D'Hooghe M, B., P. Haentjens, G. Nagels, T. D'Hooghe and J. De Keyser (2012). "Menarche, oral contraceptives, pregnancy and progression of disability in relapsing onset and progressive onset multiple sclerosis." J Neurol **259**(5): 855-861.

Dagur, P. K., A. Biancotto, E. Stansky, H. N. Sen, R. B. Nussenblatt and J. P. McCoy (2014). "Secretion of interleukin-17 by CD8+ T cells expressing CD146 (MCAM)." Clin Immunol **152**(1-2): 36-47.

Dagur, P. K., A. Biancotto, L. Wei, H. N. Sen, M. Yao, W. Strober, R. B. Nussenblatt and J. P. McCoy, Jr. (2011). "MCAM-expressing CD4(+) T cells in peripheral blood secrete IL-17A and are significantly elevated in inflammatory autoimmune diseases." J Autoimmun **37**(4): 319-327.

Dagur, P. K., G. Tatlici, M. Gourley, L. Samsel, N. Raghavachari, P. Liu, D. Liu and J. P. McCoy, Jr. (2010). "CD146+ T lymphocytes are increased in both the peripheral circulation and in the synovial effusions of patients with various musculoskeletal diseases and display pro-inflammatory gene profiles." Cytometry B Clin Cytom **78**(2): 88-95.

Daneman, R., L. Zhou, A. A. Kebede and B. A. Barres (2010). "Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis." Nature **468**(7323): 562-566.

Das Sarma, J., B. Ciric, R. Marek, S. Sadhukhan, M. L. Caruso, J. Shafagh, D. C. Fitzgerald, K. S. Shindler and A. Rostami (2009). "Functional interleukin-17 receptor A is expressed in central nervous system glia and upregulated in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroinflammation **6**: 14.

Dean, G. and M. Elian (1997). "Age at immigration to England of Asian and Caribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **63**(5): 565-568.

Denic, A., B. Wootla and M. Rodriguez (2013). "CD8(+) T cells in multiple sclerosis." Expert Opin Ther Targets **17**(9): 1053-1066.

Di Maggio, G., R. Santangelo, S. Guerrieri, M. Bianco, L. Ferrari, S. Medaglini, M. Rodegher, B. Colombo, L. Moiola, R. Chieffo, U. Del Carro, V. Martinelli, G. Comi and L. Leocani (2014). "Optical coherence tomography and visual evoked potentials: which is more sensitive in multiple sclerosis?" Mult Scler.

di Penta, A., B. Moreno, S. Reix, B. Fernandez-Diez, M. Villanueva, O. Errea, N. Escala, K. Vandebroek, J. X. Comella and P. Villoslada (2013). "Oxidative stress and proinflammatory cytokines contribute to demyelination and axonal damage in a cerebellar culture model of neuroinflammation." PLoS One **8**(2): e54722.

Dobson, R., G. Giovannoni and S. Ramagopalan (2013). "The month of birth effect in multiple sclerosis: systematic review, meta-analysis and effect of latitude." J Neurol Neurosurg Psychiatry **84**(4): 427-432.

Dobson, R., S. Ramagopalan, A. Davis and G. Giovannoni (2013). "Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude." J Neurol Neurosurg Psychiatry **84**(8): 909-914.

Dohgu, S., M. A. Fleegal-DeMotta and W. A. Banks (2011). "Lipopolysaccharide-enhanced transcellular transport of HIV-1 across the blood-brain barrier is mediated by luminal microvessel IL-6 and GM-CSF." J Neuroinflammation **8**: 167.

Domingues, H. S., M. Mues, H. Lassmann, H. Wekerle and G. Krishnamoorthy (2010). "Functional and pathogenic differences of Th1 and Th17 cells in experimental autoimmune encephalomyelitis." PLoS One **5**(11): e15531.

Dominguez-Villar, M., C. M. Baecher-Allan and D. A. Hafler (2011). "Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease." Nat Med **17**(6): 673-675.

Duan, H., Y. Luo, H. Hao, L. Feng, Y. Zhang, D. Lu, S. Xing, J. Feng, D. Yang, L. Song and X. Yan (2013). "Soluble CD146 in cerebrospinal fluid of active multiple sclerosis." Neuroscience **235**: 16-26.

Duan, H., S. Xing, Y. Luo, L. Feng, I. Gramaglia, Y. Zhang, D. Lu, Q. Zeng, K. Fan, J. Feng, D. Yang, Z. Qin, P. O. Couraud, I. A. Romero, B. Weksler and X. Yan (2013). "Targeting endothelial CD146 attenuates neuroinflammation by limiting lymphocyte extravasation to the CNS." Sci Rep **3**: 1687.

Durelli, L., L. Conti, M. Clerico, D. Boselli, G. Contessa, P. Ripellino, B. Ferrero, P. Eid and F. Novelli (2009). "T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta." Ann Neurol **65**(5): 499-509.

Durelli, L., B. Ferrero, A. Oggero, E. Verdun, M. R. Bongioanni, E. Gentile, G. L. Isoardo, A. Ricci, E. Rota, B. Bergamasco, M. Durazzo, G. Saracco, M. A. Biava, P. C. Brossa, L. Giorda, R. Pagni and G. Aimò (1999). "Autoimmune events during interferon beta-1b treatment for multiple sclerosis." J Neurol Sci **162**(1): 74-83.

Dursun, E., D. Gezen-Ak and S. Yilmazer (2011). "A novel perspective for Alzheimer's disease: vitamin D receptor suppression by amyloid-beta and preventing the amyloid-beta induced alterations by vitamin D in cortical neurons." J Alzheimers Dis **23**(2): 207-219.

Dutta, R. and B. D. Trapp (2007). "Pathogenesis of axonal and neuronal damage in multiple sclerosis." Neurology **68**(22 Suppl 3): S22-31; discussion S43-54.

Ebers, G. C. and A. D. Sadovnick (1993). "The geographic distribution of multiple sclerosis: a review." Neuroepidemiology **12**(1): 1-5.

El-Behi, M., B. Ciric, H. Dai, Y. Yan, M. Cullimore, F. Safavi, G. X. Zhang, B. N. Dittel and A. Rostami (2011). "The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF." Nat Immunol.

Elshal, M. F., S. S. Khan, Y. Takahashi, M. A. Solomon and J. P. McCoy, Jr. (2005). "CD146 (Mel-CAM), an adhesion marker of endothelial cells, is a novel marker of lymphocyte subset activation in normal peripheral blood." Blood **106**(8): 2923-2924.

Engelhardt, B. (2006). "Molecular mechanisms involved in T cell migration across the blood-brain barrier." J Neural Transm **113**(4): 477-485.

Engelhardt, B. and C. Coisne (2011). "Fluids and barriers of the CNS establish immune privilege by confining immune surveillance to a two-walled castle moat surrounding the CNS castle." Fluids Barriers CNS **8**(1): 4.

Engelhardt, B. and S. Liebner (2014). "Novel insights into the development and maintenance of the blood-brain barrier." Cell Tissue Res **355**(3): 687-699.

Eugster, H. P., K. Frei, M. Kopf, H. Lassmann and A. Fontana (1998). "IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis." Eur J Immunol **28**(7): 2178-2187.

Evans, C., S. G. Beland, S. Kulaga, C. Wolfson, E. Kingwell, J. Marriott, M. Koch, N. Makhani, S. Morrow, J. Fisk, J. Dykeman, N. Jette, T. Pringsheim and R. A. Marrie (2013). "Incidence and prevalence of multiple sclerosis in the Americas: a systematic review." Neuroepidemiology **40**(3): 195-210.

Feinstein, A. (2011). "Multiple sclerosis and depression." Mult Scler **17**(11): 1276-1281.

Fenstermacher, J., P. Gross, N. Sposito, V. Acuff, S. Pettersen and K. Gruber (1988). "Structural and functional variations in capillary systems within the brain." Ann N Y Acad Sci **529**: 21-30.

Ferber, I. A., S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton and C. G. Fathman (1996). "Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE)." J Immunol **156**(1): 5-7.

Fernandez, O. (2014). "Alemtuzumab in the treatment of multiple sclerosis." J Inflamm Res **7**: 19-27.

Fernandez, O., C. Arnal-Garcia, R. Arroyo-Gonzalez, L. Brieva, M. C. Calles-Hernandez, B. Casanova-Estruch, M. Comabella, V. de Las Heras, J. A. Garcia-Merino, M. A. Hernandez-Perez, G. Izquierdo, E. Matas, J. E. Meca-Lallana, M. M. Mendibe-Bilbao, D. Munoz-Garcia, J. Olascoaga, C. Oreja-Guevara, J. M. Prieto, L. Ramio-Torrenta, A. Rodriguez-Antiguedad, A. Saiz, N. Tellez, L. M. Villar, M. Tintore and G. P. Grupo Post-Ectrimis (2013). "Review of the novelties presented at the 28th Congress of the European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS) (II)." Rev Neurol **57**(6): 269-281.

Fiddes, B., J. Wason, A. Kempainen, M. Ban, A. Compston and S. Sawcer (2013). "Confounding underlies the apparent month of birth effect in multiple sclerosis." Ann Neurol **73**(6): 714-720.

Figarella-Branger, D., N. Schleinitz, B. Boutiere-Albanese, L. Camoin, N. Bardin, S. Guis, J. Pouget, C. Cognet, J. F. Pellissier and F. Dignat-George (2006). "Platelet-endothelial cell adhesion molecule-1 and CD146: soluble levels and in situ expression of cellular adhesion molecules implicated in the cohesion of endothelial cells in idiopathic inflammatory myopathies." J Rheumatol **33**(8): 1623-1630.

Flanagan, K., K. Fitzgerald, J. Baker, K. Regnstrom, S. Gardai, F. Bard, S. Mocci, P. Seto, M. You, C. Larochele, A. Prat, S. Chow, L. Li, C. Vandevent, W. Zago, C. Lorenzana, C. Nishioka, J. Hoffman, R. Botelho, C. Willits, K. Tanaka, J. Johnston and T. Yednock (2012). "Laminin-411 is a vascular ligand for MCAM and facilitates TH17 cell entry into the CNS." PLoS One **7**(7): e40443.

Fleming, J. O., A. Isaak, J. E. Lee, C. C. Luzzio, M. D. Carrithers, T. D. Cook, A. S. Field, J. Boland and Z. Fabry (2011). "Probiotic helminth administration in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 1 study." Mult Scler **17**(6): 743-754.

Franzen, R., D. Bouhy and J. Schoenen (2004). "Nervous system injury: focus on the inflammatory cytokine 'granulocyte-macrophage colony stimulating factor'." Neurosci Lett **361**(1-3): 76-78.

Freedman, D. M., M. Dosemeci and M. C. Alavanja (2000). "Mortality from multiple sclerosis and exposure to residential and occupational solar radiation: a case-control study based on death certificates." Occup Environ Med **57**(6): 418-421.

Freedman, M. S., D. Selchen, D. L. Arnold, A. Prat, B. Banwell, M. Yeung, D. Morgenthau, Y. Lapierre and G. Canadian Multiple Sclerosis Working (2013). "Treatment optimization in

MS: Canadian MS Working Group updated recommendations." Can J Neurol Sci **40**(3): 307-323.

Friese, M. A. and L. Fugger (2005). "Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy?" Brain **128**(Pt 8): 1747-1763.

Friese, M. A., K. B. Jakobsen, L. Friis, R. Etzensperger, M. J. Craner, R. M. McMahon, L. T. Jensen, V. Huygelen, E. Y. Jones, J. I. Bell and L. Fugger (2008). "Opposing effects of HLA class I molecules in tuning autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis." Nat Med **14**(11): 1227-1235.

Frischer, J. M., S. Bramow, A. Dal-Bianco, C. F. Lucchinetti, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P. S. Sorensen and H. Lassmann (2009). "The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains." Brain **132**(Pt 5): 1175-1189.

Frohman, E. M., M. K. Racke and C. S. Raine (2006). "Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis." N Engl J Med **354**(9): 942-955.

Gaitan, M. I., C. D. Shea, I. E. Evangelou, R. D. Stone, K. M. Fenton, B. Bielekova, L. Massacesi and D. S. Reich (2011). "Evolution of the blood-brain barrier in newly forming multiple sclerosis lesions." Ann Neurol **70**(1): 22-29.

Gale, C. R. and C. N. Martyn (1995). "Migrant studies in multiple sclerosis." Prog Neurobiol **47**(4-5): 425-448.

Galea, I., M. Bernardes-Silva, P. A. Forse, N. van Rooijen, R. S. Liblau and V. H. Perry (2007). "An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier." J Exp Med **204**(9): 2023-2030.

Garcia-Hernandez Mde, L., H. Hamada, J. B. Reome, S. K. Misra, M. P. Tighe and R. W. Dutton (2010). "Adoptive transfer of tumor-specific Tc17 effector T cells controls the growth of B16 melanoma in mice." J Immunol **184**(8): 4215-4227.

Gearing, A. J., P. Beckett, M. Christodoulou, M. Churchill, J. Clements, A. H. Davidson, A. H. Drummond, W. A. Galloway, R. Gilbert, J. L. Gordon and et al. (1994). "Processing of tumour necrosis factor-alpha precursor by metalloproteinases." Nature **370**(6490): 555-557.

Ghoreschi, K., A. Laurence, X. P. Yang, C. M. Tato, M. J. McGeachy, J. E. Konkel, H. L. Ramos, L. Wei, T. S. Davidson, N. Bouladoux, J. R. Grainger, Q. Chen, Y. Kanno, W. T. Watford, H. W. Sun, G. Eberl, E. M. Shevach, Y. Belkaid, D. J. Cua, W. Chen and J. J. O'Shea (2010). "Generation of pathogenic T(H)17 cells in the absence of TGF-beta signalling." Nature **467**(7318): 967-971.

Gilliet, M. and Y. J. Liu (2002). "Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells." J Exp Med **195**(6): 695-704.

- Gimsa, U., N. A. Mitchison and M. C. Brunner-Weinzierl (2013). "Immune privilege as an intrinsic CNS property: astrocytes protect the CNS against T-cell-mediated neuroinflammation." Mediators Inflamm **2013**: 320519.
- Gocke, A. R., P. D. Cravens, L. H. Ben, R. Z. Hussain, S. C. Northrop, M. K. Racke and A. E. Lovett-Racke (2007). "T-bet regulates the fate of Th1 and Th17 lymphocytes in autoimmunity." J Immunol **178**(3): 1341-1348.
- Goncalves, A., A. F. Ambrosio and R. Fernandes (2013). "Regulation of claudins in blood-tissue barriers under physiological and pathological states." Tissue Barriers **1**(3): e24782.
- Gourraud, P. A., H. F. Harbo, S. L. Hauser and S. E. Baranzini (2012). "The genetics of multiple sclerosis: an up-to-date review." Immunol Rev **248**(1): 87-103.
- Goverman, J. (2009). "Autoimmune T cell responses in the central nervous system." Nat Rev Immunol **9**(6): 393-407.
- Goverman, J., A. Perchellet and E. S. Huseby (2005). "The role of CD8(+) T cells in multiple sclerosis and its animal models." Curr Drug Targets Inflamm Allergy **4**(2): 239-245.
- Grabovsky, V., S. Feigelson, C. Chen, D. A. Bleijs, A. Peled, G. Cinamon, F. Baleux, F. Arenzana-Seisdedos, T. Lapidot, Y. van Kooyk, R. R. Lobb and R. Alon (2000). "Subsecond induction of alpha4 integrin clustering by immobilized chemokines stimulates leukocyte tethering and rolling on endothelial vascular cell adhesion molecule 1 under flow conditions." J Exp Med **192**(4): 495-506.
- Graesser, D., S. Mahooti and J. A. Madri (2000). "Distinct roles for matrix metalloproteinase-2 and alpha4 integrin in autoimmune T cell extravasation and residency in brain parenchyma during experimental autoimmune encephalomyelitis." J Neuroimmunol **109**(2): 121-131.
- Granberg, T., J. Martola, M. Kristoffersen-Wiberg, P. Aspelin and S. Fredrikson (2013). "Radiologically isolated syndrome--incidental magnetic resonance imaging findings suggestive of multiple sclerosis, a systematic review." Mult Scler **19**(3): 271-280.
- Gravano, D. M. and K. K. Hoyer (2013). "Promotion and prevention of autoimmune disease by CD8+ T cells." J Autoimmun **45**: 68-79.
- Gray, E., K. Kemp, K. Hares, J. Redondo, C. Rice, N. Scolding and A. Wilkins (2014). "Increased microglial catalase activity in multiple sclerosis grey matter." Brain Res **1559**: 55-64.
- Gray, E., T. L. Thomas, S. Betmouni, N. Scolding and S. Love (2008). "Elevated myeloperoxidase activity in white matter in multiple sclerosis." Neurosci Lett **444**(2): 195-198.

Griffin, G. K., G. Newton, M. L. Tarrío, D. X. Bu, E. Maganto-Garcia, V. Azcutia, P. Alcaide, N. Gräbe, F. W. Luscinskas, K. J. Croce and A. H. Lichtman (2012). "IL-17 and TNF-alpha sustain neutrophil recruitment during inflammation through synergistic effects on endothelial activation." J Immunol **188**(12): 6287-6299.

Grifka-Walk, H. M., S. J. Lalor and B. M. Segal (2013). "Highly polarized Th17 cells induce EAE via a T-bet independent mechanism." Eur J Immunol **43**(11): 2824-2831.

Grossman, R. I., B. H. Braffman, J. R. Brorson, H. I. Goldberg, D. H. Silberberg and F. Gonzalez-Scarano (1988). "Multiple sclerosis: serial study of gadolinium-enhanced MR imaging." Radiology **169**(1): 117-122.

Guezguez, B., P. Vigneron, N. Lamerant, C. Kieda, T. Jaffredo and D. Dunon (2007). "Dual role of melanoma cell adhesion molecule (MCAM)/CD146 in lymphocyte endothelium interaction: MCAM/CD146 promotes rolling via microvilli induction in lymphocyte and is an endothelial adhesion receptor." J Immunol **179**(10): 6673-6685.

Guillot, X., L. Semerano, N. Saidenberg-Kermanac'h, G. Falgarone and M. C. Boissier (2010). "Vitamin D and inflammation." Joint Bone Spine **77**(6): 552-557.

Haak, S., A. L. Croxford, K. Kreymborg, F. L. Heppner, S. Pouly, B. Becher and A. Waisman (2009). "IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice." J Clin Invest **119**(1): 61-69.

Hadjinicolaou, A. V., L. Wu, B. Fang, P. A. Watson, F. C. Hall and R. Busch (2013). "Relationship of CD146 expression to activation of circulating T cells: exploratory studies in healthy donors and patients with connective tissue diseases." Clin Exp Immunol **174**(1): 73-88.

Hall, C. N., C. Reynell, B. Gesslein, N. B. Hamilton, A. Mishra, B. A. Sutherland, F. M. O'Farrell, A. M. Buchan, M. Lauritzen and D. Attwell (2014). "Capillary pericytes regulate cerebral blood flow in health and disease." Nature **508**(7494): 55-60.

Handel, A. E., A. J. Williamson, G. Disanto, R. Dobson, G. Giovannoni and S. V. Ramagopalan (2011). "Smoking and multiple sclerosis: an updated meta-analysis." PLoS One **6**(1): e16149.

Handel, A. E., A. J. Williamson, G. Disanto, L. Handunnetthi, G. Giovannoni and S. V. Ramagopalan (2010). "An updated meta-analysis of risk of multiple sclerosis following infectious mononucleosis." PLoS One **5**(9).

Handunnetthi, L., S. V. Ramagopalan and G. C. Ebers (2010). "Multiple sclerosis, vitamin D, and HLA-DRB1*15." Neurology **74**(23): 1905-1910.

Haorah, J., B. Knipe, J. Leibhart, A. Ghorpade and Y. Persidsky (2005). "Alcohol-induced oxidative stress in brain endothelial cells causes blood-brain barrier dysfunction." J Leukoc Biol **78**(6): 1223-1232.

Hara, H., Y. Nanri, E. Tabata, S. Mitsutake and T. Tabira (2011). "Identification of astrocyte-derived immune suppressor factor that induces apoptosis of autoreactive T cells." J Neuroimmunol.

Hart, P. H., S. Gorman and J. J. Finlay-Jones (2011). "Modulation of the immune system by UV radiation: more than just the effects of vitamin D?" Nat Rev Immunol **11**(9): 584-596.

Hashioka, S., A. Klegeris, H. Qing and P. L. McGeer (2011). "STAT3 inhibitors attenuate interferon-gamma-induced neurotoxicity and inflammatory molecule production by human astrocytes." Neurobiol Dis **41**(2): 299-307.

Hauser, S. L. (2008). "Multiple lessons for multiple sclerosis." N Engl J Med **359**(17): 1838-1841.

Hauser, S. L., A. K. Bhan, F. Gilles, M. Kemp, C. Kerr and H. L. Weiner (1986). "Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions." Ann Neurol **19**(6): 578-587.

Hauser, S. L., E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould, C. H. Smith and H. T. Group (2008). "B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis." N Engl J Med **358**(7): 676-688.

Havla, J., I. Kleiter and T. Kumpfel (2013). "Bridging, switching or drug holidays - how to treat a patient who stops natalizumab?" Ther Clin Risk Manag **9**: 361-369.

Hayes, C. E., M. T. Cantorna and H. F. DeLuca (1997). "Vitamin D and multiple sclerosis." Proc Soc Exp Biol Med **216**(1): 21-27.

Hedstrom, A. K., M. Baarnhielm, T. Olsson and L. Alfredsson (2011). "Exposure to environmental tobacco smoke is associated with increased risk for multiple sclerosis." Mult Scler **17**(7): 788-793.

Hedstrom, A. K., J. Hillert, T. Olsson and L. Alfredsson (2013). "Smoking and multiple sclerosis susceptibility." Eur J Epidemiol **28**(11): 867-874.

Hedstrom, A. K., I. Lima Bomfim, L. Barcellos, M. Gianfrancesco, C. Schaefer, I. Kockum, T. Olsson and L. Alfredsson (2014). "Interaction between adolescent obesity and HLA risk genes in the etiology of multiple sclerosis." Neurology **82**(10): 865-872.

Hedstrom, A. K., T. Olsson and L. Alfredsson (2012). "High body mass index before age 20 is associated with increased risk for multiple sclerosis in both men and women." Mult Scler **18**(9): 1334-1336.

Hewison, M. (2011). "An update on vitamin D and human immunity." Clin Endocrinol (Oxf).

Hildebrandt, H. and P. Eling (2014). "A longitudinal study on fatigue, depression, and their relation to neurocognition in multiple sclerosis." J Clin Exp Neuropsychol.

Hinrichs, C. S., A. Kaiser, C. M. Paulos, L. Cassard, L. Sanchez-Perez, B. Heemskerk, C. Wrzesinski, Z. A. Borman, P. Muranski and N. P. Restifo (2009). "Type 17 CD8+ T cells display enhanced antitumor immunity." Blood **114**(3): 596-599.

H

intzen, R. (2013). "Multiple sclerosis: Month of birth effect in MS--fact or artefact?" Nat Rev Neurol **9**(9): 489-490.

Hirota, K., J. H. Duarte, M. Veldhoen, E. Hornsby, Y. Li, D. J. Cua, H. Ahlfors, C. Wilhelm, M. Tolaini, U. Menzel, A. Garafalaki, A. J. Potocnik and B. Stockinger (2011). "Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses." Nat Immunol **12**(3): 255-263.

Hoftberger, R., F. Aboul-Enein, W. Brueck, C. Lucchinetti, M. Rodriguez, M. Schmidbauer, K. Jellinger and H. Lassmann (2004). "Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions." Brain Pathol **14**(1): 43-50.

Holick, M. F. (1995). "Environmental factors that influence the cutaneous production of vitamin D." Am J Clin Nutr **61**(3 Suppl): 638S-645S.

Holman, D. W., R. S. Klein and R. M. Ransohoff (2011). "The blood-brain barrier, chemokines and multiple sclerosis." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 220-230.

Honorat, J. A., M. Kinoshita, T. Okuno, K. Takata, T. Koda, S. Tada, T. Shirakura, H. Fujimura, H. Mochizuki, S. Sakoda and Y. Nakatsuji (2013). "Xanthine oxidase mediates axonal and myelin loss in a murine model of multiple sclerosis." PLoS One **8**(8): e71329.

Horwitz, M. S., C. F. Evans, D. B. McGavern, M. Rodriguez and M. B. Oldstone (1997). "Primary demyelination in transgenic mice expressing interferon-gamma." Nat Med **3**(9): 1037-1041.

Hu, W. and C. F. Lucchinetti (2009). "The pathological spectrum of CNS inflammatory demyelinating diseases." Semin Immunopathol **31**(4): 439-453.

Huber, J. D., R. D. Egleton and T. P. Davis (2001). "Molecular physiology and pathophysiology of tight junctions in the blood-brain barrier." Trends Neurosci **24**(12): 719-725.

Huber, M., S. Heink, A. Pagenstecher, K. Reinhard, J. Ritter, A. Visekruna, A. Guralnik, N. Bollig, K. Jeltsch, C. Heinemann, E. Wittmann, T. Buch, O. Prazeres da Costa, A. Brustle, D. Brenner, T. W. Mak, H. W. Mittrucker, B. Tackenberg, T. Kamradt and M. Lohoff (2013). "IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis." J Clin Invest **123**(1): 247-260.

Hummel, V., B. A. Kallmann, S. Wagner, T. Fuller, A. Bayas, J. C. Tonn, E. N. Benveniste, K. V. Toyka and P. Rieckmann (2001). "Production of MMPs in human cerebral endothelial cells and their role in shedding adhesion molecules." J Neuropathol Exp Neurol **60**(4): 320-327.

Huppert, J., D. Closhen, A. Croxford, R. White, P. Kulig, E. Pietrowski, I. Bechmann, B. Becher, H. J. Luhmann, A. Waisman and C. R. Kuhlmann (2010). "Cellular mechanisms of IL-17-induced blood-brain barrier disruption." FASEB J **24**(4): 1023-1034.

Huseby, E. S., D. Liggitt, T. Brabb, B. Schnabel, C. Ohlen and J. Goverman (2001). "A pathogenic role for myelin-specific CD8(+) T cells in a model for multiple sclerosis." J Exp Med **194**(5): 669-676.

Huynh, J. L. and P. Casaccia (2013). "Epigenetic mechanisms in multiple sclerosis: implications for pathogenesis and treatment." Lancet Neurol **12**(2): 195-206.

Hypponen, E. (2010). "Vitamin D and increasing incidence of type 1 diabetes-evidence for an association?" Diabetes Obes Metab **12**(9): 737-743.

Ifergan, I. (2011). Modulation de la réponse immunitaire dans le cerveau par la barrière hémato-encéphalique: implication en sclérose en plaques. PhD, Université de Montréal.

Ifergan, I., H. Kebir, J. I. Alvarez, G. Marceau, M. Bernard, L. Bourbonniere, J. Poirier, P. Duquette, P. J. Talbot, N. Arbour and A. Prat (2011). "Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on alpha4 integrin." Brain **134**(Pt 12): 3560-3577.

Ifergan, I., H. Kebir, S. Terouz, J. I. Alvarez, M. A. Lecuyer, S. Gendron, L. Bourbonniere, I. R. Dunay, A. Bouthillier, R. Moundjian, A. Fontana, A. Haqqani, A. Klopstein, M. Prinz, R. Lopez-Vales, T. Birchler and A. Prat (2011). "Role of Ninjurin-1 in the migration of myeloid cells to central nervous system inflammatory lesions." Ann Neurol **70**(5): 751-763.

Ifergan, I., K. Wosik, R. Cayrol, H. Kebir, C. Auger, M. Bernard, A. Bouthillier, R. Moundjian, P. Duquette and A. Prat (2006). "Statins reduce human blood-brain barrier permeability and restrict leukocyte migration: relevance to multiple sclerosis." Ann Neurol **60**(1): 45-55.

Ikeda, E., I. Flamme and W. Risau (1996). "Developing brain cells produce factors capable of inducing the HT7 antigen, a blood-brain barrier-specific molecule, in chick endothelial cells." Neurosci Lett **209**(3): 149-152.

Imaizumi, S., T. Kondo, M. A. Deli, G. Gobbel, F. Joo, C. J. Epstein, T. Yoshimoto and P. H. Chan (1996). "The influence of oxygen free radicals on the permeability of the monolayer of cultured brain endothelial cells." *Neurochem Int* **29**(2): 205-211.

Inaloo, S. and S. Haghbin (2013). "Multiple Sclerosis in Children." *Iran J Child Neurol* **7**(2): 1-10.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., D. A. Hafler, A. Compston, S. Sawcer, E. S. Lander, M. J. Daly, P. L. De Jager, P. I. de Bakker, S. B. Gabriel, D. B. Mirel, A. J. Ivinson, M. A. Pericak-Vance, S. G. Gregory, J. D. Rioux, J. L. McCauley, J. L. Haines, L. F. Barcellos, B. Cree, J. R. Oksenberg and S. L. Hauser (2007). "Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study." *N Engl J Med* **357**(9): 851-862.

International Multiple Sclerosis Genetics, C., C. Wellcome Trust Case Control, S. Sawcer, G. Hellenthal, M. Pirinen, C. C. Spencer, N. A. Patsopoulos, L. Moutsianas, A. Dilthey, Z. Su, C. Freeman, S. E. Hunt, S. Edkins, E. Gray, D. R. Booth, S. C. Potter, A. Goris, G. Band, A. B. Oturai, A. Strange, J. Saarela, C. Bellenguez, B. Fontaine, M. Gillman, B. Hemmer, R. Gwilliam, F. Zipp, A. Jayakumar, R. Martin, S. Leslie, S. Hawkins, E. Giannoulatou, S. D'Alfonso, H. Blackburn, F. Martinelli Boneschi, J. Liddle, H. F. Harbo, M. L. Perez, A. Spurkland, M. J. Waller, M. P. Mycko, M. Ricketts, M. Comabella, N. Hammond, I. Kockum, O. T. McCann, M. Ban, P. Whittaker, A. Kempainen, P. Weston, C. Hawkins, S. Widaa, J. Zajicek, S. Dronov, N. Robertson, S. J. Bumpstead, L. F. Barcellos, R. Ravindrarajah, R. Abraham, L. Alfredsson, K. Ardlie, C. Aubin, A. Baker, K. Baker, S. E. Baranzini, L. Bergamaschi, R. Bergamaschi, A. Bernstein, A. Berthele, M. Boggild, J. P. Bradfield, D. Brassat, S. A. Broadley, D. Buck, H. Butzkueven, R. Capra, W. M. Carroll, P. Cavalla, E. G. Celius, S. Cepok, R. Chiavacci, F. Clerget-Darpoux, K. Clysters, G. Comi, M. Cossburn, I. Cournu-Rebeix, M. B. Cox, W. Cozen, B. A. Cree, A. H. Cross, D. Cusi, M. J. Daly, E. Davis, P. I. de Bakker, M. Debouverie, B. D'Hooghe M, K. Dixon, R. Dobosi, B. Dubois, D. Ellinghaus, I. Elovaara, F. Esposito, C. Fontenille, S. Foote, A. Franke, D. Galimberti, A. Ghezzi, J. Glessner, R. Gomez, O. Gout, C. Graham, S. F. Grant, F. R. Guerini, H. Hakonarson, P. Hall, A. Hamsten, H. P. Hartung, R. N. Heard, S. Heath, J. Hobart, M. Hoshi, C. Infante-Duarte, G. Ingram, W. Ingram, T. Islam, M. Jagodic, M. Kabesch, A. G. Kermodé, T. J. Kilpatrick, C. Kim, N. Klopp, K. Koivisto, M. Larsson, M. Lathrop, J. S. Lechner-Scott, M. A. Leone, V. Leppa, U. Liljedahl, I. L. Bomfim, R. R. Lincoln, J. Link, J. Liu, A. R. Lorentzen, S. Lupoli, F. Macciardi, T. Mack, M. Marriott, V. Martinelli, D. Mason, J. L. McCauley, F. Mentch, I. L. Mero, T. Mihalova, X. Montalban, J. Mottershead, K. M. Myhr, P. Naldi, W. Ollier, A. Page, A. Palotie, J. Pelletier, L. Piccio, T. Pickersgill, F. Piehl, S. Pobywajlo, H. L. Quach, P. P. Ramsay, M. Reunanen, R. Reynolds, J. D. Rioux, M. Rodegher, S. Roesner, J. P. Rubio, I. M. Ruckert, M. Salvetti, E. Salvi, A. Santaniello, C. A. Schaefer, S. Schreiber, C. Schulze, R. J. Scott, F. Sellebjerg, K. W. Selmaj, D. Sexton, L. Shen, B. Simms-Acuna, S. Skidmore, P. M. Sleiman, C. Smestad, P. S. Sorensen, H. B. Sondergaard, J. Stankovich, R. C. Strange, A. M. Sulonen, E. Sundqvist, A. C. Syvanen, F. Taddeo, B. Taylor, J. M. Blackwell, P. Tienari, E. Bramon, A. Tourbah, M. A. Brown, E. Tronczynska, J. P. Casas, N. Tubridy, A. Corvin, J. Vickery, J. Jankowski, P. Villoslada, H. S. Markus, K. Wang, C. G. Mathew, J. Wason, C. N. Palmer, H. E. Wichmann, R. Plomin, E. Willoughby, A.

Rautanen, J. Winkelmann, M. Wittig, R. C. Trembath, J. Yaouanq, A. C. Viswanathan, H. Zhang, N. W. Wood, R. Zuvich, P. Deloukas, C. Langford, A. Duncanson, J. R. Oksenberg, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, T. Olsson, J. Hillert, A. J. Ivinson, P. L. De Jager, L. Peltonen, G. J. Stewart, D. A. Hafler, S. L. Hauser, G. McVean, P. Donnelly and A. Compston (2011). "Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis." Nature **476**(7359): 214-219.

Investigators, C. T., A. J. Coles, D. A. Compston, K. W. Selmaj, S. L. Lake, S. Moran, D. H. Margolin, K. Norris and P. K. Tandon (2008). "Alemtuzumab vs. interferon beta-1a in early multiple sclerosis." N Engl J Med **359**(17): 1786-1801.

Jiang, T., J. Zhuang, H. Duan, Y. Luo, Q. Zeng, K. Fan, H. Yan, D. Lu, Z. Ye, J. Hao, J. Feng, D. Yang and X. Yan (2012). "CD146 is a coreceptor for VEGFR-2 in tumor angiogenesis." Blood **120**(11): 2330-2339.

Jiang, Y., A. Wu, C. Zhu, R. Pi, S. Chen, Y. Liu, L. Ma, D. Zhu and X. Chen (2013). "The protective effect of berberine against neuronal damage by inhibiting matrix metalloproteinase-9 and laminin degradation in experimental autoimmune encephalomyelitis." Neurol Res **35**(4): 360-368.

Jobin, C., C. Larochelle, H. Parpal, P. K. Coyle and P. Duquette (2010). "Gender issues in multiple sclerosis: an update." Womens Health (Lond Engl) **6**(6): 797-820.

Johnson, H. L., F. Jin, I. Pirko and A. J. Johnson (2014). "Theiler's murine encephalomyelitis virus as an experimental model system to study the mechanism of blood-brain barrier disruption." J Neurovirol **20**(2): 107-112.

Johnson, J. P., J. M. Lehmann, B. G. Stade, U. Rothbacher, C. Sers and G. Riethmuller (1989). "Functional aspects of three molecules associated with metastasis development in human malignant melanoma." Invasion Metastasis **9**(6): 338-350.

Jouve, N., N. Despoix, M. Espeli, L. Gauthier, S. Cypowyj, K. Fallague, C. Schiff, F. Dignat-George, F. Vely and A. S. Leroyer (2013). "The involvement of CD146 and its novel ligand Galectin-1 in apoptotic regulation of endothelial cells." J Biol Chem **288**(4): 2571-2579.

Kabat, E. A., D. H. Moore and H. Landow (1942). "An Electrophoretic Study of the Protein Components in Cerebrospinal Fluid and Their Relationship to the Serum Proteins." J Clin Invest **21**(5): 571-577.

Kaltsonoudis, E., P. V. Voulgari, S. Konitsiotis and A. A. Drosos (2014). "Demyelination and other neurological adverse events after anti-TNF therapy." Autoimmun Rev **13**(1): 54-58.

Kamiyama, T., H. Watanabe, M. Iijima, A. Miyazaki and S. Iwamoto (2012). "Coexpression of CCR6 and CD146 (MCAM) is a marker of effector memory T-helper 17 cells." J Dermatol **39**(10): 838-842.

Kamouchi, M., T. Ago and T. Kitazono (2010). "Brain Pericytes: Emerging Concepts and Functional Roles in Brain Homeostasis." Cell Mol Neurobiol.

Kang, Z., C. Z. Altuntas, M. F. Gulen, C. Liu, N. Giltiay, H. Qin, L. Liu, W. Qian, R. M. Ransohoff, C. Bergmann, S. Stohlman, V. K. Tuohy and X. Li (2010). "Astrocyte-restricted ablation of interleukin-17-induced Act1-mediated signaling ameliorates autoimmune encephalomyelitis." Immunity **32**(3): 414-425.

Kaplan, A., K. J. Spiller, C. Towne, K. C. Kanning, G. T. Choe, A. Geber, T. Akay, P. Aebischer and C. E. Henderson (2014). "Neuronal matrix metalloproteinase-9 is a determinant of selective neurodegeneration." Neuron **81**(2): 333-348.

Kappos, L., D. Li, P. A. Calabresi, P. O'Connor, A. Bar-Or, F. Barkhof, M. Yin, D. Leppert, R. Glanzman, J. Tinbergen and S. L. Hauser (2011). "Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial." Lancet **378**(9805): 1779-1787.

Kappos, L., E. W. Radue, P. O'Connor, C. Polman, R. Hohlfeld, P. Calabresi, K. Selmaj, C. Agoropoulou, M. Leyk, L. Zhang-Auberson and P. Burtin (2010). "A placebo-controlled trial of oral fingolimod in relapsing multiple sclerosis." N Engl J Med **362**(5): 387-401.

Kawanokuchi, J., K. Shimizu, A. Nitta, K. Yamada, T. Mizuno, H. Takeuchi and A. Suzumura (2008). "Production and functions of IL-17 in microglia." J Neuroimmunol **194**(1-2): 54-61.

Kebir, H., I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette and A. Prat (2009). "Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis." Ann Neurol **66**(3): 390-402.

Kebir, H., K. Kreymborg, I. Ifergan, A. Dodelet-Devillers, R. Cayrol, M. Bernard, F. Giuliani, N. Arbour, B. Becher and A. Prat (2007). "Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation." Nat Med **13**(10): 1173-1175.

Kennedy, J., P. O'Connor, A. D. Sadovnick, M. Perara, I. Yee and B. Banwell (2006). "Age at onset of multiple sclerosis may be influenced by place of residence during childhood rather than ancestry." Neuroepidemiology **26**(3): 162-167.

Khan, R. S., K. Dine, J. Das Sarma and K. S. Shindler (2014). "SIRT1 Activating compounds reduce oxidative stress mediated neuronal loss in viral induced CNS demyelinating disease." Acta Neuropathol Commun **2**(1): 3.

Kim, S. J. and S. R. Lee (2014). "Protective effect of melatonin against transient global cerebral ischemia-induced neuronal cell damage via inhibition of matrix metalloproteinase-9." Life Sci **94**(1): 8-16.

Kim, S. R., Y. H. Bae, S. K. Bae, K. S. Choi, K. H. Yoon, T. H. Koo, H. O. Jang, I. Yun, K. W. Kim, Y. G. Kwon, M. A. Yoo and M. K. Bae (2008). "Visfatin enhances ICAM-1 and

VCAM-1 expression through ROS-dependent NF-kappaB activation in endothelial cells." Biochim Biophys Acta **1783**(5): 886-895.

Kimball, S. M., M. R. Ursell, P. O'Connor and R. Vieth (2007). "Safety of vitamin D3 in adults with multiple sclerosis." Am J Clin Nutr **86**(3): 645-651.

Kivisakk, P., D. J. Mahad, M. K. Callahan, C. Trebst, B. Tucky, T. Wei, L. Wu, E. S. Baekkevold, H. Lassmann, S. M. Staugaitis, J. J. Campbell and R. M. Ransohoff (2003). "Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(14): 8389-8394.

Klein, L. and B. Kyewski (2000). "'Promiscuous' expression of tissue antigens in the thymus: a key to T-cell tolerance and autoimmunity?" J Mol Med (Berl) **78**(9): 483-494.

Kleinewietfeld, M., A. Manzel, J. Titze, H. Kvakan, N. Yosef, R. A. Linker, D. N. Muller and D. A. Hafler (2013). "Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells." Nature **496**(7446): 518-522.

Kniesel, U. and H. Wolburg (2000). "Tight junctions of the blood-brain barrier." Cell Mol Neurobiol **20**(1): 57-76.

Koch, M. W., L. M. Metz, S. M. Agrawal and V. W. Yong (2013). "Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis." J Neurol Sci **324**(1-2): 10-16.

Koch, M. W., L. M. Metz and O. Kovalchuk (2013). "Epigenetic changes in patients with multiple sclerosis." Nat Rev Neurol **9**(1): 35-43.

Kohm, A. P., P. A. Carpentier, H. A. Anger and S. D. Miller (2002). "Cutting edge: CD4+CD25+ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **169**(9): 4712-4716.

Komatsu, N., K. Okamoto, S. Sawa, T. Nakashima, M. Oh-hora, T. Kodama, S. Tanaka, J. A. Bluestone and H. Takayanagi (2014). "Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis." Nat Med **20**(1): 62-68.

Komiyama, Y., S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo and Y. Iwakura (2006). "IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **177**(1): 566-573.

Kooij, G., J. Kroon, D. Paul, A. Reijerkerk, D. Geerts, S. M. van der Pol, B. van Het Hof, J. A. Drexhage, S. J. van Vliet, L. H. Hekking, J. D. van Buul, J. S. Pachter and H. E. de Vries (2014). "P-glycoprotein regulates trafficking of CD8(+) T cells to the brain parenchyma." Acta Neuropathol **127**(5): 699-711.

Korn, T., E. Bettelli, M. Oukka and V. K. Kuchroo (2009). "IL-17 and Th17 Cells." Annu Rev Immunol **27**: 485-517.

Koyama, Y. and S. Michinaga (2012). "Regulations of astrocytic functions by endothelins: roles in the pathophysiological responses of damaged brains." J Pharmacol Sci **118**(4): 401-407.

Krakauer, M., P. Sorensen, M. Khademi, T. Olsson and F. Sellebjerg (2008). "Increased IL-10 mRNA and IL-23 mRNA expression in multiple sclerosis: interferon-beta treatment increases IL-10 mRNA expression while reducing IL-23 mRNA expression." Mult Scler **14**(5): 622-630.

Krakovski, M. and T. Owens (1996). "Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis." Eur J Immunol **26**(7): 1641-1646.

Kreymborg, K., R. Etzensperger, L. Dumoutier, S. Haak, A. Rebollo, T. Buch, F. L. Heppner, J. C. Renauld and B. Becher (2007). "IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **179**(12): 8098-8104.

Kroenke, M. A., T. J. Carlson, A. V. Andjelkovic and B. M. Segal (2008). "IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition." J Exp Med **205**(7): 1535-1541.

Kroenke, M. A., S. W. Chensue and B. M. Segal (2010). "EAE mediated by a non-IFN-gamma/non-IL-17 pathway." Eur J Immunol **40**(8): 2340-2348.

Kroenke, M. A. and B. M. Segal (2011). "IL-23 modulated myelin-specific T cells induce EAE via an IFN-gamma driven, IL-17 independent pathway." Brain Behav Immun **25**(5): 932-937.

Krupp, L. B., D. J. Serafin and C. Christodoulou (2010). "Multiple sclerosis-associated fatigue." Expert Rev Neurother **10**(9): 1437-1447.

Kuijk, L. M., E. J. Klaver, G. Kooij, S. M. van der Pol, P. Heijnen, S. C. Bruijns, H. Kringel, E. Pinelli, G. Kraal, H. E. de Vries, C. D. Dijkstra, G. Bouma and I. van Die (2012). "Soluble helminth products suppress clinical signs in murine experimental autoimmune encephalomyelitis and differentially modulate human dendritic cell activation." Mol Immunol **51**(2): 210-218.

Kurtzke, J. F. (2013). "Epidemiology in multiple sclerosis: a pilgrim's progress." Brain **136**(Pt 9): 2904-2917.

Kutzelnigg, A. and H. Lassmann (2014). "Pathology of multiple sclerosis and related inflammatory demyelinating diseases." Handb Clin Neurol **122**: 15-58.

Kutzelnigg, A., C. F. Lucchinetti, C. Stadelmann, W. Bruck, H. Rauschka, M. Bergmann, M. Schmidbauer, J. E. Parisi and H. Lassmann (2005). "Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis." Brain **128**(Pt 11): 2705-2712.

Langer-Gould, A., S. M. Brara, B. E. Beaber and C. Koebnick (2013). "Childhood obesity and risk of pediatric multiple sclerosis and clinically isolated syndrome." Neurology **80**(6): 548-552.

Langrish, C. L., Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein and D. J. Cua (2005). "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." J Exp Med **201**(2): 233-240.

Larochelle, C., J. I. Alvarez and A. Prat (2011). "How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis?" FEBS Lett **585**(23): 3770-3780.

Larochelle, C., R. Cayrol, H. Kebir, J. I. Alvarez, M. A. Lecuyer, I. Ifergan, E. Viel, L. Bourbonniere, D. Beauseigle, S. Terouz, L. Hachehouche, S. Gendron, J. Poirier, C. Jobin, P. Duquette, K. Flanagan, T. Yednock, N. Arbour and A. Prat (2012). "Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system." Brain **135**(Pt 10): 2906-2924.

Larochelle, C., F. Grand'maison, G. P. Bernier, M. Latour, J. F. Cailhier and A. Prat (2014). "Thrombotic thrombocytopenic purpura-hemolytic uremic syndrome in relapsing-remitting multiple sclerosis patients on high-dose interferon beta." Mult Scler.

Larochelle, C. and A. Prat (2013). "Les interactions BHE/leucocytes dans la sclérose en plaques." Médecine Sciences Amérique **2**(2): 1-14.

Lassmann, H. (2013). "Multiple sclerosis: Lessons from molecular neuropathology." Exp Neurol.

Lassmann, H. (2014). "Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis." Glia.

Lee, H. S., K. Namkoong, D. H. Kim, K. J. Kim, Y. H. Cheong, S. S. Kim, W. B. Lee and K. Y. Kim (2004). "Hydrogen peroxide-induced alterations of tight junction proteins in bovine brain microvascular endothelial cells." Microvasc Res **68**(3): 231-238.

Lee, S. W., W. J. Kim, Y. K. Choi, H. S. Song, M. J. Son, I. H. Gelman, Y. J. Kim and K. W. Kim (2003). "SSECKS regulates angiogenesis and tight junction formation in blood-brain barrier." Nat Med **9**(7): 900-906.

Lehmann, J. M., B. Holzmann, E. W. Breitbart, P. Schmiegelow, G. Riethmuller and J. P. Johnson (1987). "Discrimination between benign and malignant cells of melanocytic lineage by two novel antigens, a glycoprotein with a molecular weight of 113,000 and a protein with a molecular weight of 76,000." Cancer Res **47**(3): 841-845.

- Lehmann, J. M., G. Riethmuller and J. P. Johnson (1989). "MUC18, a marker of tumor progression in human melanoma, shows sequence similarity to the neural cell adhesion molecules of the immunoglobulin superfamily." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(24): 9891-9895.
- Leuenberger, T., M. Paterka, E. Reuter, J. Herz, R. A. Niesner, H. Radbruch, T. Bopp, F. Zipp and V. Siffrin (2013). "The role of CD8+ T cells and their local interaction with CD4+ T cells in myelin oligodendrocyte glycoprotein35-55-induced experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **191**(10): 4960-4968.
- Li, B., L. Zhong, X. Yang, T. Andersson, M. Huang and S. J. Tang (2011). "WNT5A signaling contributes to Abeta-induced neuroinflammation and neurotoxicity." PLoS One **6**(8): e22920.
- Li, G., J. Kalabis, X. Xu, F. Meier, M. Oka, T. Bogenrieder and M. Herlyn (2003). "Reciprocal regulation of MelCAM and AKT in human melanoma." Oncogene **22**(44): 6891-6899.
- Li, Y., N. Chu, A. Hu, B. Gran, A. Rostami and G. X. Zhang (2007). "Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia." Brain **130**(Pt 2): 490-501.
- Liu, W., J. Hendren, X. J. Qin, J. Shen and K. J. Liu (2009). "Normobaric hyperoxia attenuates early blood-brain barrier disruption by inhibiting MMP-9-mediated occludin degradation in focal cerebral ischemia." J Neurochem **108**(3): 811-820.
- Liu, Y., I. Teige, B. Birnir and S. Issazadeh-Navikas (2006). "Neuron-mediated generation of regulatory T cells from encephalitogenic T cells suppresses EAE." Nat Med **12**(5): 518-525.
- Looker, A. C., B. Dawson-Hughes, M. S. Calvo, E. W. Gunter and N. R. Sahyoun (2002). "Serum 25-hydroxyvitamin D status of adolescents and adults in two seasonal subpopulations from NHANES III." Bone **30**(5): 771-777.
- Lovera, J. and B. Kovner (2012). "Cognitive impairment in multiple sclerosis." Curr Neurol Neurosci Rep **12**(5): 618-627.
- Lowther, D. E. and D. A. Hafler (2012). "Regulatory T cells in the central nervous system." Immunol Rev **248**(1): 156-169.
- Lu, L., H. J. Kim, M. B. Werneck and H. Cantor (2008). "Regulation of CD8+ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(49): 19420-19425.
- Lucas, R. M., A. M. Hughes, M. L. Lay, A. L. Ponsonby, D. E. Dwyer, B. V. Taylor and M. P. Pender (2011). "Epstein-Barr virus and multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **82**(10): 1142-1148.

Lucchinetti, C., W. Bruck, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez and H. Lassmann (2000). "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." Ann Neurol **47**(6): 707-717.

Lucchinetti, C. F., B. F. Popescu, R. F. Bunyan, N. M. Moll, S. F. Roemer, H. Lassmann, W. Bruck, J. E. Parisi, B. W. Scheithauer, C. Giannini, S. D. Weigand, J. Mandrekar and R. M. Ransohoff (2011). "Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis." N Engl J Med **365**(23): 2188-2197.

Ma, X., S. L. Reynolds, B. J. Baker, X. Li, E. N. Benveniste and H. Qin (2010). "IL-17 enhancement of the IL-6 signaling cascade in astrocytes." J Immunol **184**(9): 4898-4906.

Maeda, A. and R. A. Sobel (1996). "Matrix metalloproteinases in the normal human central nervous system, microglial nodules, and multiple sclerosis lesions." J Neuropathol Exp Neurol **55**(3): 300-309.

Maggi, L., V. Santarlasci, M. Capone, A. Peired, F. Frosali, S. Q. Crome, V. Querci, M. Fambrini, F. Liotta, M. K. Levings, E. Maggi, L. Cosmi, S. Romagnani and F. Annunziato (2010). "CD161 is a marker of all human IL-17-producing T-cell subsets and is induced by RORC." Eur J Immunol **40**(8): 2174-2181.

Mangalam, A. K., D. Luckey, S. Giri, M. Smart, L. R. Pease, M. Rodriguez and C. S. David (2012). "Two discreet subsets of CD8 T cells modulate PLP(91-110) induced experimental autoimmune encephalomyelitis in HLA-DR3 transgenic mice." J Autoimmun **38**(4): 344-353.

Mangano, E. N., S. Peters, D. Litteljohn, R. So, C. Bethune, J. Bobyn, M. Clarke and S. Hayley (2011). "Granulocyte macrophage-colony stimulating factor protects against substantia nigra dopaminergic cell loss in an environmental toxin model of Parkinson's disease." Neurobiol Dis **43**(1): 99-112.

Manouchehrinia, A., C. R. Tench, J. Maxted, R. H. Bibani, J. Britton and C. S. Constantinescu (2013). "Tobacco smoking and disability progression in multiple sclerosis: United Kingdom cohort study." Brain **136**(Pt 7): 2298-2304.

Mardiguan, S., S. Serres, E. Ladds, S. J. Campbell, P. Wilainam, C. McFadyen, M. McAteer, R. P. Choudhury, P. Smith, F. Saunders, G. Watt, N. R. Sibson and D. C. Anthony (2013). "Anti-IL-17A treatment reduces clinical score and VCAM-1 expression detected by in vivo magnetic resonance imaging in chronic relapsing EAE ABH mice." Am J Pathol **182**(6): 2071-2081.

Massa, P. T., K. Ozato and D. E. McFarlin (1993). "Cell type-specific regulation of major histocompatibility complex (MHC) class I gene expression in astrocytes, oligodendrocytes, and neurons." Glia **8**(3): 201-207.

Matusevicius, D., P. Kivisakk, B. He, N. Kostulas, V. Ozenci, S. Fredrikson and H. Link (1999). "Interleukin-17 mRNA expression in blood and CSF mononuclear cells is augmented in multiple sclerosis." Mult Scler **5**(2): 101-104.

McDonald, W. I., A. Compston, G. Edan, D. Goodkin, H. P. Hartung, F. D. Lublin, H. F. McFarland, D. W. Paty, C. H. Polman, S. C. Reingold, M. Sandberg-Wollheim, W. Sibley, A. Thompson, S. van den Noort, B. Y. Weinshenker and J. S. Wolinsky (2001). "Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis." Ann Neurol **50**(1): 121-127.

McGeachy, M. J., Y. Chen, C. M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W. M. Blumenschein, T. K. McClanahan, J. J. O'Shea and D. J. Cua (2009). "The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo." Nat Immunol **10**(3): 314-324.

McQualter, J. L., R. Darwiche, C. Ewing, M. Onuki, T. W. Kay, J. A. Hamilton, H. H. Reid and C. C. Bernard (2001). "Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis." J Exp Med **194**(7): 873-882.

Michel, L., Y. Foucher, S. Vukusic, C. Confavreux, J. de Seze, D. Brassat, M. Clanet, P. Clavelou, J. C. Ouallet, B. Brochet, J. Pelletier, P. Labauge, C. Lebrun, E. Lepage, F. Le Frere, M. Jacq-Foucher, P. Barriere, S. Wiertlewski, D. A. Laplaud and P. Club Francophone de la Sclerose En (2012). "Increased risk of multiple sclerosis relapse after in vitro fertilisation." J Neurol Neurosurg Psychiatry **83**(8): 796-802.

Mikaeloff, Y., G. Caridade, M. Tardieu, S. Suissa and K. s. group (2007). "Parental smoking at home and the risk of childhood-onset multiple sclerosis in children." Brain **130**(Pt 10): 2589-2595.

Miller, D. H., F. Fazekas, X. Montalban, S. C. Reingold and M. Trojano (2014). "Pregnancy, sex and hormonal factors in multiple sclerosis." Mult Scler **20**(5): 527-536.

Miller, S. D. and W. J. Karpus (2007). "Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse." Curr Protoc Immunol **Chapter 15**: Unit 15 11.

Mills, L., C. Tellez, S. Huang, C. Baker, M. McCarty, L. Green, J. M. Gudas, X. Feng and M. Bar-Eli (2002). "Fully human antibodies to MCAM/MUC18 inhibit tumor growth and metastasis of human melanoma." Cancer Res **62**(17): 5106-5114.

Millward, J. M., M. Lobner, R. D. Wheeler and T. Owens (2010). "Inflammation in the central nervous system and Th17 responses are inhibited by IFN-gamma-Induced IL-18 binding protein." J Immunol **185**(4): 2458-2466.

Minten, C., C. Alt, M. Gentner, E. Frei, U. Deutsch, R. Lyck, N. Schaeren-Wiemers, A. Rot and B. Engelhardt (2014). "DARC shuttles inflammatory chemokines across the blood-brain barrier during autoimmune central nervous system inflammation." Brain.

- Monteiro, J., R. Hingorani, R. Pergolizzi, B. Apatoff and P. K. Gregersen (1995). "Clonal dominance of CD8+ T-cell in multiple sclerosis." Ann N Y Acad Sci **756**: 310-312.
- Mrass, P. and W. Weninger (2006). "Immune cell migration as a means to control immune privilege: lessons from the CNS and tumors." Immunol Rev **213**: 195-212.
- Munger, K. L., J. Bentzen, B. Laursen, E. Stenager, N. Koch-Henriksen, T. I. Sorensen and J. L. Baker (2013). "Childhood body mass index and multiple sclerosis risk: a long-term cohort study." Mult Scler **19**(10): 1323-1329.
- Munger, K. L., L. I. Levin, B. W. Hollis, N. S. Howard and A. Ascherio (2006). "Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis." JAMA **296**(23): 2832-2838.
- Munoz, F. J., J. A. Godoy, W. Cerpa, I. M. Poblete, J. P. Huidobro-Toro and N. C. Inestrosa (2014). "Wnt-5a increases NO and modulates NMDA receptor in rat hippocampal neurons." Biochem Biophys Res Commun **444**(2): 189-194.
- Na, S. Y., A. Hermann, M. Sanchez-Ruiz, A. Storch, M. Deckert and T. Hunig (2012). "Oligodendrocytes enforce immune tolerance of the uninfected brain by purging the peripheral repertoire of autoreactive CD8+ T cells." Immunity **37**(1): 134-146.
- Nagyoszi, P., I. Wilhelm, A. E. Farkas, C. Fazakas, N. T. Dung, J. Hasko and I. A. Krizbai (2010). "Expression and regulation of toll-like receptors in cerebral endothelial cells." Neurochem Int **57**(5): 556-564.
- Najafian, N., T. Chitnis, A. D. Salama, B. Zhu, C. Benou, X. Yuan, M. R. Clarkson, M. H. Sayegh and S. J. Khoury (2003). "Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model." J Clin Invest **112**(7): 1037-1048.
- Narayanan, D., H. Cheng, K. N. Bonem, R. Saenz, R. A. Tang and L. J. Frishman (2014). "Tracking changes over time in retinal nerve fiber layer and ganglion cell-inner plexiform layer thickness in multiple sclerosis." Mult Scler.
- Nashold, F. E., K. M. Spach, J. A. Spanier and C. E. Hayes (2009). "Estrogen controls vitamin D3-mediated resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis by controlling vitamin D3 metabolism and receptor expression." J Immunol **183**(6): 3672-3681.
- Navikas, V., D. Matuskevicius, M. Soderstrom, S. Fredrikson, P. Kivisakk, A. Ljungdahl, B. Hojeberg and H. Link (1996). "Increased interleukin-6 mRNA expression in blood and cerebrospinal fluid mononuclear cells in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **64**(1): 63-69.
- Neidhart, M., R. Wehrli, P. Bruhlmann, B. A. Michel, R. E. Gay and S. Gay (1999). "Synovial fluid CD146 (MUC18), a marker for synovial membrane angiogenesis in rheumatoid arthritis." Arthritis Rheum **42**(4): 622-630.

Neumann, H., I. M. Medana, J. Bauer and H. Lassmann (2002). "Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases." Trends Neurosci **25**(6): 313-319.

Niland, B., G. Miklossy, K. Banki, W. E. Biddison, L. Casciola-Rosen, A. Rosen, D. Martinvalet, J. Lieberman and A. Perl (2010). "Cleavage of transaldolase by granzyme B causes the loss of enzymatic activity with retention of antigenicity for multiple sclerosis patients." J Immunol **184**(7): 4025-4032.

Nimitphong, H. and M. F. Holick (2011). "Vitamin D, neurocognitive functioning and immunocompetence." Curr Opin Clin Nutr Metab Care **14**(1): 7-14.

Nishioku, T., J. Matsumoto, S. Dohgu, N. Sumi, K. Miyao, F. Takata, H. Shuto, A. Yamauchi and Y. Kataoka (2010). "Tumor necrosis factor-alpha mediates the blood-brain barrier dysfunction induced by activated microglia in mouse brain microvascular endothelial cells." J Pharmacol Sci **112**(2): 251-254.

Nitta, T., M. Hata, S. Gotoh, Y. Seo, H. Sasaki, N. Hashimoto, M. Furuse and S. Tsukita (2003). "Size-selective loosening of the blood-brain barrier in claudin-5-deficient mice." J Cell Biol **161**(3): 653-660.

Noseworthy, J. H., C. Lucchinetti, M. Rodriguez and B. G. Weinshenker (2000). "Multiple sclerosis." N Engl J Med **343**(13): 938-952.

O'Connor, R. A., H. Cambrook, K. Huettner and S. M. Anderton (2013). "T-bet is essential for Th1-mediated, but not Th17-mediated, CNS autoimmune disease." Eur J Immunol **43**(11): 2818-2823.

O'Gorman, C., R. Lin, J. Stankovich and S. A. Broadley (2013). "Modelling genetic susceptibility to multiple sclerosis with family data." Neuroepidemiology **40**(1): 1-12.

O'Gorman, C., R. Lucas and B. Taylor (2012). "Environmental risk factors for multiple sclerosis: a review with a focus on molecular mechanisms." Int J Mol Sci **13**(9): 11718-11752.

O'Riordan, J. I., A. J. Thompson, D. P. Kingsley, D. G. MacManus, B. E. Kendall, P. Rudge, W. I. McDonald and D. H. Miller (1998). "The prognostic value of brain MRI in clinically isolated syndromes of the CNS. A 10-year follow-up." Brain **121** (Pt 3): 495-503.

Oh, J. and P. W. O'Connor (2013). "Safety, tolerability, and efficacy of oral therapies for relapsing-remitting multiple sclerosis." CNS Drugs **27**(8): 591-609.

Okuda, D. T., E. M. Mowry, A. Beheshtian, E. Waubant, S. E. Baranzini, D. S. Goodin, S. L. Hauser and D. Pelletier (2009). "Incidental MRI anomalies suggestive of multiple sclerosis: the radiologically isolated syndrome." Neurology **72**(9): 800-805.

Okuda, Y., S. Sakoda, C. C. Bernard, H. Fujimura, Y. Saeki, T. Kishimoto and T. Yanagihara (1998). "IL-6-deficient mice are resistant to the induction of experimental autoimmune

encephalomyelitis provoked by myelin oligodendrocyte glycoprotein." Int Immunol **10**(5): 703-708.

Oldendorf, W. H., M. E. Cornford and W. J. Brown (1977). "The large apparent work capability of the blood-brain barrier: a study of the mitochondrial content of capillary endothelial cells in brain and other tissues of the rat." Ann Neurol **1**(5): 409-417.

Olesen, S. P. (1987). "Free oxygen radicals decrease electrical resistance of microvascular endothelium in brain." Acta Physiol Scand **129**(2): 181-187.

Osada, T., Y. H. Gu, M. Kanazawa, Y. Tsubota, B. T. Hawkins, M. Spatz, R. Milner and G. J. del Zoppo (2011). "Interendothelial claudin-5 expression depends on cerebral endothelial cell-matrix adhesion by beta(1)-integrins." J Cereb Blood Flow Metab **31**(10): 1972-1985.

Ouhtit, A., R. L. Gaur, Z. Y. Abd Elmageed, A. Fernando, R. Thouta, A. K. Trappey, M. E. Abdraboh, H. I. El-Sayyad, P. Rao and M. G. Raj (2009). "Towards understanding the mode of action of the multifaceted cell adhesion receptor CD146." Biochim Biophys Acta **1795**(2): 130-136.

Overall, C. M., G. A. McQuibban and I. Clark-Lewis (2002). "Discovery of chemokine substrates for matrix metalloproteinases by exosite scanning: a new tool for degradomics." Biol Chem **383**(7-8): 1059-1066.

Owens, T., I. Bechmann and B. Engelhardt (2008). "Perivascular spaces and the two steps to neuroinflammation." J Neuropathol Exp Neurol **67**(12): 1113-1121.

Pagenstecher, A., A. K. Stalder, C. L. Kincaid, S. D. Shapiro and I. L. Campbell (1998). "Differential expression of matrix metalloproteinase and tissue inhibitor of matrix metalloproteinase genes in the mouse central nervous system in normal and inflammatory states." Am J Pathol **152**(3): 729-741.

Paintlia, M. K., A. S. Paintlia, A. K. Singh and I. Singh (2011). "Synergistic activity of interleukin-17 and tumor necrosis factor-alpha enhances oxidative stress-mediated oligodendrocyte apoptosis." J Neurochem **116**(4): 508-521.

Pakpoor, J., G. Disanto, J. E. Gerber, R. Dobson, U. C. Meier, G. Giovannoni and S. V. Ramagopalan (2013). "The risk of developing multiple sclerosis in individuals seronegative for Epstein-Barr virus: a meta-analysis." Mult Scler **19**(2): 162-166.

Palace, J. (2001). "Making the diagnosis of multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **71 Suppl 2**: ii3-8.

Panitch, H. S., R. L. Hirsch, A. S. Haley and K. P. Johnson (1987). "Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon." Lancet **1**(8538): 893-895.

- Panitch, H. S., R. L. Hirsch, J. Schindler and K. P. Johnson (1987). "Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system." Neurology **37**(7): 1097-1102.
- Pardini, M., A. Uccelli, J. Grafman, O. Yaldizli, G. Mancardi and L. Roccatagliata (2014). "Isolated cognitive relapses in multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry.
- Parks, W. C., C. L. Wilson and Y. S. Lopez-Boado (2004). "Matrix metalloproteinases as modulators of inflammation and innate immunity." Nat Rev Immunol **4**(8): 617-629.
- Patel, J. and R. Balabanov (2012). "Molecular mechanisms of oligodendrocyte injury in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis." Int J Mol Sci **13**(8): 10647-10659.
- Paty, D. W. and D. K. Li (1993). "Interferon beta-1b is effective in relapsing-remitting multiple sclerosis. II. MRI analysis results of a multicenter, randomized, double-blind, placebo-controlled trial. UBC MS/MRI Study Group and the IFNB Multiple Sclerosis Study Group." Neurology **43**(4): 662-667.
- Paty, D. W., J. J. Oger, L. F. Kastrukoff, S. A. Hashimoto, J. P. Hooge, A. A. Eisen, K. A. Eisen, S. J. Purves, M. D. Low, V. Brandejs and et al. (1988). "MRI in the diagnosis of MS: a prospective study with comparison of clinical evaluation, evoked potentials, oligoclonal banding, and CT." Neurology **38**(2): 180-185.
- Perchellet, A., T. Brabb and J. M. Goverman (2008). "Crosspresentation by nonhematopoietic and direct presentation by hematopoietic cells induce central tolerance to myelin basic protein." Proc Natl Acad Sci U S A **105**(37): 14040-14045.
- Perillo, N. L., K. E. Pace, J. J. Seilhamer and L. G. Baum (1995). "Apoptosis of T cells mediated by galectin-1." Nature **378**(6558): 736-739.
- Peters, A., 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 and V. K. Kuchroo (2011). "Th17 cells induce ectopic lymphoid follicles in central nervous system tissue inflammation." Immunity **35**(6): 986-996.
- Peterson, J. W., L. Bo, S. Mork, A. Chang and B. D. Trapp (2001). "Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions." Ann Neurol **50**(3): 389-400.
- Pickl, W. F., O. Majdic, G. F. Fischer, P. Petzelbauer, I. Fae, M. Waclavicek, J. Stockl, C. Scheinecker, T. Vidicki, H. Aschauer, J. P. Johnson and W. Knapp (1997). "MUC18/MCAM (CD146), an activation antigen of human T lymphocytes." J Immunol **158**(5): 2107-2115.

Pierson, E., S. B. Simmons, L. Castelli and J. M. Goverman (2012). "Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity." Immunol Rev **248**(1): 205-215.

Pilz, S., A. Tomaschitz, W. Marz, C. Drechsler, E. Ritz, A. Zittermann, E. Cavalier, T. R. Pieber, J. M. Lappe, W. B. Grant, M. F. Holick and J. M. Dekker (2011). "Vitamin D, cardiovascular disease and mortality." Clin Endocrinol (Oxf) **75**(5): 575-584.

Pollinger, B., G. Krishnamoorthy, K. Berer, H. Lassmann, M. R. Bosl, R. Dunn, H. S. Domingues, A. Holz, F. C. Kurschus and H. Wekerle (2009). "Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells." J Exp Med **206**(6): 1303-1316.

Polman, C. H., P. W. O'Connor, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, D. H. Miller, J. T. Phillips, F. D. Lublin, G. Giovannoni, A. Wajgt, M. Toal, F. Lynn, M. A. Panzara and A. W. Sandrock (2006). "A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis." N Engl J Med **354**(9): 899-910.

Polman, C. H., S. C. Reingold, B. Banwell, M. Clanet, J. A. Cohen, M. Filippi, K. Fujihara, E. Havrdova, M. Hutchinson, L. Kappos, F. D. Lublin, X. Montalban, P. O'Connor, M. Sandberg-Wollheim, A. J. Thompson, E. Waubant, B. Weinshenker and J. S. Wolinsky (2011). "Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria." Ann Neurol **69**(2): 292-302.

Ponomarev, E. D., L. P. Shriver, K. Maresz, J. Pedras-Vasconcelos, D. Verthelyi and B. N. Dittel (2007). "GM-CSF production by autoreactive T cells is required for the activation of microglial cells and the onset of experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **178**(1): 39-48.

Poppe, A. Y., C. Wolfson and B. Zhu (2008). "Prevalence of multiple sclerosis in Canada: a systematic review." Can J Neurol Sci **35**(5): 593-601.

Poser, C. M., D. W. Paty, L. Scheinberg, W. I. McDonald, F. A. Davis, G. C. Ebers, K. P. Johnson, W. A. Sibley, D. H. Silberberg and W. W. Tourtellotte (1983). "New diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines for research protocols." Ann Neurol **13**(3): 227-231.

Potter, S., T. Chan-Ling, H. J. Ball, H. Mansour, A. Mitchell, L. Maluish and N. H. Hunt (2006). "Perforin mediated apoptosis of cerebral microvascular endothelial cells during experimental cerebral malaria." Int J Parasitol **36**(4): 485-496.

Prat, A., K. Biernacki, K. Wosik and J. P. Antel (2001). "Glial cell influence on the human blood-brain barrier." Glia **36**(2): 145-155.

Quandt, J. and K. Dorovini-Zis (2004). "The beta chemokines CCL4 and CCL5 enhance adhesion of specific CD4+ T cell subsets to human brain endothelial cells." J Neuropathol Exp Neurol **63**(4): 350-362.

Ramagopalan, S., I. Yee, J. Byrnes, C. Guimond, G. Ebers and D. Sadovnick (2012). "Term pregnancies and the clinical characteristics of multiple sclerosis: a population based study." J Neurol Neurosurg Psychiatry **83**(8): 793-795.

Ramagopalan, S. V., J. K. Byrnes, S. M. Orton, D. A. Dymment, C. Guimond, I. M. Yee, G. C. Ebers and A. D. Sadovnick (2010). "Sex ratio of multiple sclerosis and clinical phenotype." Eur J Neurol **17**(4): 634-637.

Ramagopalan, S. V., A. E. Handel, G. Giovannoni, S. Rutherford Siegel, G. C. Ebers and G. Chaplin (2011). "Relationship of UV exposure to prevalence of multiple sclerosis in England." Neurology **76**(16): 1410-1414.

Ramagopalan, S. V., J. D. Lee, I. M. Yee, C. Guimond, A. L. Traboulsee, G. C. Ebers and A. D. Sadovnick (2013). "Association of smoking with risk of multiple sclerosis: a population-based study." J Neurol **260**(7): 1778-1781.

Ramagopalan, S. V., N. J. Maugeri, L. Handunnetthi, M. R. Lincoln, S. M. Orton, D. A. Dymment, G. C. Deluca, B. M. Herrera, M. J. Chao, A. D. Sadovnick, G. C. Ebers and J. C. Knight (2009). "Expression of the multiple sclerosis-associated MHC class II Allele HLA-DRB1*1501 is regulated by vitamin D." PLoS Genet **5**(2): e1000369.

Rangachari, M. and V. K. Kuchroo (2013). "Using EAE to better understand principles of immune function and autoimmune pathology." J Autoimmun **45**: 31-39.

Ransohoff, R. M. (2005). "Natalizumab and PML." Nat Neurosci **8**(10): 1275.

Ransohoff, R. M., P. Kivisakk and G. Kidd (2003). "Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system." Nat Rev Immunol **3**(7): 569-581.

Rattan, V., C. Sultana, Y. Shen and V. K. Kalra (1997). "Oxidant stress-induced transendothelial migration of monocytes is linked to phosphorylation of PECAM-1." Am J Physiol **273**(3 Pt 1): E453-461.

Reboldi, A., C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt and F. 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." Nat Immunol **10**(5): 514-523.

Reiner, S. L. (2007). "Development in motion: helper T cells at work." Cell **129**(1): 33-36.

Rio, J., A. Rovira, M. Tintore, E. Huerga, C. Nos, N. Tellez, C. Tur, M. Comabella and X. Montalban (2008). "Relationship between MRI lesion activity and response to IFN-beta in relapsing-remitting multiple sclerosis patients." Mult Scler **14**(4): 479-484.

Rosenberg, G. A. and Y. Yang (2007). "Vasogenic edema due to tight junction disruption by matrix metalloproteinases in cerebral ischemia." Neurosurg Focus **22**(5): E4.

Rosti-Otajarvi, E. and P. Hamalainen (2013). "Behavioural symptoms and impairments in multiple sclerosis: a systematic review and meta-analysis." Mult Scler **19**(1): 31-45.

Rothhammer, V., S. Heink, F. Petermann, R. Srivastava, M. C. Claussen, B. Hemmer and T. Korn (2011). "Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of alpha4 integrin expression during EAE." J Exp Med **208**(12): 2465-2476.

Runia, T. F., E. D. van Pelt-Gravesteijn and R. Q. Hintzen (2012). "Recent gains in clinical multiple sclerosis research." CNS Neurol Disord Drug Targets **11**(5): 497-505.

Ryu, H. J., J. E. Kim, M. J. Kim, H. J. Kwon, S. W. Suh, H. K. Song and T. C. Kang (2010). "The protective effects of interleukin-18 and interferon-gamma on neuronal damages in the rat hippocampus following status epilepticus." Neuroscience **170**(3): 711-721.

Sad, S., R. Marcotte and T. R. Mosmann (1995). "Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines." Immunity **2**(3): 271-279.

Saikali, P., J. P. Antel, C. L. Pittet, J. Newcombe and N. Arbour (2010). "Contribution of astrocyte-derived IL-15 to CD8 T cell effector functions in multiple sclerosis." J Immunol **185**(10): 5693-5703.

Salmen, A. and R. Gold (2014). "Mode of action and clinical studies with fumarates in multiple sclerosis." Exp Neurol.

Sasaki, K., A. Bean, S. Shah, E. Schutten, P. G. Huseby, B. Peters, Z. T. Shen, V. Vanguri, D. Liggitt and E. S. Huseby (2014). "Relapsing-Remitting Central Nervous System Autoimmunity Mediated by GFAP-Specific CD8 T Cells." J Immunol **192**(7): 3029-3042.

Sathyanadan, K., C. Coisne, G. Enzmann, U. Deutsch and B. Engelhardt (2014). "PSGL-1 and E/P-selectins are essential for T-cell rolling in inflamed CNS microvessels but dispensable for initiation of EAE." Eur J Immunol.

Satoh, T., M. Tajima, D. Wakita, H. Kitamura and T. Nishimura (2012). "The development of IL-17/IFN-gamma-double producing CTLs from Tc17 cells is driven by epigenetic suppression of Socs3 gene promoter." Eur J Immunol **42**(9): 2329-2342.

Saxena, A., S. Desbois, N. Carrie, M. Lawand, L. T. Mars and R. S. Liblau (2012). "Tc17 CD8+ T cells potentiate Th1-mediated autoimmune diabetes in a mouse model." J Immunol **189**(6): 3140-3149.

Saxena, A., G. Martin-Blondel, L. T. Mars and R. S. Liblau (2011). "Role of CD8 T cell subsets in the pathogenesis of multiple sclerosis." FEBS Lett **585**(23): 3758-3763.

Scalfari, A., A. Neuhaus, M. Daumer, P. A. Muraro and G. C. Ebers (2014). "Onset of secondary progressive phase and long-term evolution of multiple sclerosis." J Neurol Neurosurg Psychiatry **85**(1): 67-75.

Schabitz, W. R., C. Kruger, C. Pitzer, D. Weber, R. Laage, N. Gassler, J. Aronowski, W. Mier, F. Kirsch, T. Dittgen, A. Bach, C. Sommer and A. Schneider (2008). "A neuroprotective function for the hematopoietic protein granulocyte-macrophage colony stimulating factor (GM-CSF)." J Cereb Blood Flow Metab **28**(1): 29-43.

Schneider, R., A. N. Mohebiany, I. Ifergan, D. Beauseigle, P. Duquette, A. Prat and N. Arbour (2011). "B cell-derived IL-15 enhances CD8 T cell cytotoxicity and is increased in multiple sclerosis patients." J Immunol **187**(8): 4119-4128.

Schon, M., T. Kahne, H. Gollnick and M. P. Schon (2005). "Expression of gp130 in tumors and inflammatory disorders of the skin: formal proof of its identity as CD146 (MUC18, Mel-CAM)." J Invest Dermatol **125**(2): 353-363.

Schulze, C. and J. A. Firth (1993). "Immunohistochemical localization of adherens junction components in blood-brain barrier microvessels of the rat." J Cell Sci **104 (Pt 3)**: 773-782.

Sedlakova, R., R. R. Shivers and R. F. Del Maestro (1999). "Ultrastructure of the blood-brain barrier in the rabbit." J Submicrosc Cytol Pathol **31**(1): 149-161.

Sena, A., R. Couderc, J. C. Vasconcelos, V. Ferret-Sena and R. Pedrosa (2012). "Oral contraceptive use and clinical outcomes in patients with multiple sclerosis." J Neurol Sci **317**(1-2): 47-51.

Sers, C., K. Kirsch, U. Rothbacher, G. Riethmuller and J. P. Johnson (1993). "Genomic organization of the melanoma-associated glycoprotein MUC18: implications for the evolution of the immunoglobulin domains." Proc Natl Acad Sci U S A **90**(18): 8514-8518.

Sers, C., G. Riethmuller and J. P. Johnson (1994). "MUC18, a melanoma-progression associated molecule, and its potential role in tumor vascularization and hematogenous spread." Cancer Res **54**(21): 5689-5694.

Shen, H., W. Zhang, C. Abraham and J. H. Cho (2013). "Age and CD161 expression contribute to inter-individual variation in interleukin-23 response in CD8+ memory human T cells." PLoS One **8**(3): e57746.

Shrikant, P. and E. N. Benveniste (1996). "The central nervous system as an immunocompetent organ: role of glial cells in antigen presentation." J Immunol **157**(5): 1819-1822.

Shulman, Z., V. Shinder, E. Klein, V. Grabovsky, O. Yeger, E. Geron, A. Montesor, M. Bolomini-Vittori, S. W. Feigelson, T. Kirchhausen, C. Laudanna, G. Shakhar and R. Alon

(2009). "Lymphocyte crawling and transendothelial migration require chemokine triggering of high-affinity LFA-1 integrin." Immunity **30**(3): 384-396.

Sibley, W. A., C. R. Bamford and K. Clark (1985). "Clinical viral infections and multiple sclerosis." Lancet **1**(8441): 1313-1315.

Siffrin, V., H. Radbruch, R. Glumm, R. Niesner, M. Paterka, J. Herz, T. Leuenberger, S. M. Lehmann, S. Luenstedt, J. L. Rinnenthal, G. Laube, H. Luche, S. Lehnardt, H. J. Fehling, O. Griesbeck and F. Zipp (2010). "In vivo imaging of partially reversible th17 cell-induced neuronal dysfunction in the course of encephalomyelitis." Immunity **33**(3): 424-436.

Simka, M. (2009). "Blood brain barrier compromise with endothelial inflammation may lead to autoimmune loss of myelin during multiple sclerosis." Curr Neurovasc Res **6**(2): 132-139.

Simmons, S.B., Liggitt, D. and J.M. Goverman (2014). "Cytokine-regulated neutrophil recruitment is required for brain but not spinal cord inflammation during experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **193**(2):555-563

Simmons, S. B., E. R. Pierson, S. Y. Lee and J. M. Goverman (2013). "Modeling the heterogeneity of multiple sclerosis in animals." Trends Immunol **34**(8): 410-422.

Simpson, S., Jr., B. Taylor, L. Blizzard, A. L. Ponsonby, F. Pittas, H. Tremlett, T. Dwyer, P. Gies and I. van der Mei (2010). "Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis." Ann Neurol **68**(2): 193-203.

Sithu, S. D., W. R. English, P. Olson, D. Krubasik, A. H. Baker, G. Murphy and S. E. D'Souza (2007). "Membrane-type 1-matrix metalloproteinase regulates intracellular adhesion molecule-1 (ICAM-1)-mediated monocyte transmigration." J Biol Chem **282**(34): 25010-25019.

Sixt, M., B. Engelhardt, F. Pausch, R. Hallmann, O. Wendler and L. M. Sorokin (2001). "Endothelial cell laminin isoforms, laminins 8 and 10, play decisive roles in T cell recruitment across the blood-brain barrier in experimental autoimmune encephalomyelitis." J Cell Biol **153**(5): 933-946.

Skulina, C., S. Schmidt, K. Dornmair, H. Babbe, A. Roers, K. Rajewsky, H. Wekerle, R. Hohlfeld and N. Goebels (2004). "Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8+ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood." Proc Natl Acad Sci U S A **101**(8): 2428-2433.

Smolders, J., P. Menheere, A. Kessels, J. Damoiseaux and R. Hupperts (2008). "Association of vitamin D metabolite levels with relapse rate and disability in multiple sclerosis." Mult Scler **14**(9): 1220-1224.

Smolders, J., E. Peelen, M. Thewissen, P. Menheere, J. W. Tervaert, R. Hupperts and J. Damoiseaux (2009). "The relevance of vitamin D receptor gene polymorphisms for vitamin D research in multiple sclerosis." Autoimmun Rev **8**(7): 621-626.

- Solovey, A. N., L. Gui, L. Chang, J. Enenstein, P. V. Browne and R. P. Hebbel (2001). "Identification and functional assessment of endothelial P1H12." J Lab Clin Med **138**(5): 322-331.
- Sonderegger, I., G. Iezzi, R. Maier, N. Schmitz, M. Kurrer and M. Kopf (2008). "GM-CSF mediates autoimmunity by enhancing IL-6-dependent Th17 cell development and survival." J Exp Med **205**(10): 2281-2294.
- Sonderegger, I., J. Kisielow, R. Meier, C. King and M. Kopf (2008). "IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo." Eur J Immunol **38**(7): 1833-1838.
- Sorensen, P. S., A. Bertolotto, G. Edan, G. Giovannoni, R. Gold, E. Havrdova, L. Kappos, B. C. Kieseier, X. Montalban and T. Olsson (2012). "Risk stratification for progressive multifocal leukoencephalopathy in patients treated with natalizumab." Mult Scler **18**(2): 143-152.
- Sorensen, P. S., N. Koch-Henriksen, T. Petersen, M. Ravnborg, A. Oturai and F. Sellebjerg (2014). "Recurrence or rebound of clinical relapses after discontinuation of natalizumab therapy in highly active MS patients." J Neurol.
- Sospedra, M. and R. Martin (2005). "Immunology of multiple sclerosis." Annu Rev Immunol **23**: 683-747.
- Spach, K. M. and C. E. Hayes (2005). "Vitamin D3 confers protection from autoimmune encephalomyelitis only in female mice." J Immunol **175**(6): 4119-4126.
- Spath, S. and B. Becher (2013). "T-bet or not T-bet: taking the last bow on the autoimmunity stage." Eur J Immunol **43**(11): 2810-2813.
- Staples, J., A. L. Ponsonby and L. Lim (2010). "Low maternal exposure to ultraviolet radiation in pregnancy, month of birth, and risk of multiple sclerosis in offspring: longitudinal analysis." BMJ **340**: c1640.
- Staquicini, F. I., A. Tandle, S. K. Libutti, J. Sun, M. Zigler, M. Bar-Eli, F. Aliperti, E. C. Perez, J. E. Gershenwald, M. Mariano, R. Pasqualini, W. Arap and J. D. Lopes (2008). "A subset of host B lymphocytes controls melanoma metastasis through a melanoma cell adhesion molecule/MUC18-dependent interaction: evidence from mice and humans." Cancer Res **68**(20): 8419-8428.
- Starossom, S. C., I. D. Mascanfroni, J. Imitola, L. Cao, K. Raddassi, S. F. Hernandez, R. Bassil, D. O. Croci, J. P. Cerliani, D. Delacour, Y. Wang, W. Elyaman, S. J. Khoury and G. A. Rabinovich (2012). "Galectin-1 deactivates classically activated microglia and protects from inflammation-induced neurodegeneration." Immunity **37**(2): 249-263.

Stelmasiak, Z., M. Koziol-Montewka, B. Dobosz and K. Rejdak (2001). "IL-6 and sIL-6R concentration in the cerebrospinal fluid and serum of MS patients." Med Sci Monit **7**(5): 914-918.

Stromnes, I. M., L. M. Cerretti, D. Liggitt, R. A. Harris and J. M. Goverman (2008). "Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells." Nat Med **14**(3): 337-342.

Stromnes, I. M. and J. M. Goverman (2006). "Active induction of experimental allergic encephalomyelitis." Nat Protoc **1**(4): 1810-1819.

Stromnes, I. M. and J. M. Goverman (2006). "Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis." Nat Protoc **1**(4): 1952-1960.

Stys, P. K., G. W. Zamponi, J. van Minnen and J. J. Geurts (2012). "Will the real multiple sclerosis please stand up?" Nat Rev Neurosci **13**(7): 507-514.

Subileau, E. A., P. Rezaie, H. A. Davies, F. M. Colyer, J. Greenwood, D. K. Male and I. A. Romero (2009). "Expression of chemokines and their receptors by human brain endothelium: implications for multiple sclerosis." J Neuropathol Exp Neurol **68**(3): 227-240.

Subramanian, S., L. M. Miller, M. R. Grafe, A. A. Vandenbark and H. Offner (2011). "Contribution of GPR30 for 1,25 dihydroxyvitamin D(3) protection in EAE." Metab Brain Dis.

Suidan, G. L., J. W. Dickerson, Y. Chen, J. R. McDole, P. Tripathi, I. Pirko, K. B. Seroogy and A. J. Johnson (2010). "CD8 T cell-initiated vascular endothelial growth factor expression promotes central nervous system vascular permeability under neuroinflammatory conditions." J Immunol **184**(2): 1031-1040.

Suidan, G. L., J. R. McDole, Y. Chen, I. Pirko and A. J. Johnson (2008). "Induction of blood brain barrier tight junction protein alterations by CD8 T cells." PLoS One **3**(8): e3037.

Sultan, S., M. Gosling, H. Nagase and J. T. Powell (2004). "Shear stress-induced shedding of soluble intercellular adhesion molecule-1 from saphenous vein endothelium." FEBS Lett **564**(1-2): 161-165.

Sun, D., J. N. Whitaker, Z. Huang, D. Liu, C. Coleclough, H. Wekerle and C. S. Raine (2001). "Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice." J Immunol **166**(12): 7579-7587.

Tajima, M., D. Wakita, D. Noguchi, K. Chamoto, Z. Yue, K. Fugo, H. Ishigame, Y. Iwakura, H. Kitamura and T. Nishimura (2008). "IL-6-dependent spontaneous proliferation is required for the induction of colitogenic IL-17-producing CD8+ T cells." J Exp Med **205**(5): 1019-1027.

Tajima, M., D. Wakita, T. Satoh, H. Kitamura and T. Nishimura (2011). "IL-17/IFN-gamma double producing CD8+ T (Tc17/IFN-gamma) cells: a novel cytotoxic T-cell subset converted from Tc17 cells by IL-12." Int Immunol **23**(12): 751-759.

Taniura, H., M. Ito, N. Sanada, N. Kuramoto, Y. Ohno, N. Nakamichi and Y. Yoneda (2006). "Chronic vitamin D3 treatment protects against neurotoxicity by glutamate in association with upregulation of vitamin D receptor mRNA expression in cultured rat cortical neurons." J Neurosci Res **83**(7): 1179-1189.

Thome, R., L. K. Issayama, T. A. Costa, R. D. Gangi, I. T. Ferreira, C. Raposo, S. C. Lopes, M. A. Hofling, F. T. Costa and L. Verinaud (2014). "Dendritic cells treated with crude *Plasmodium berghei* extracts acquire immune-modulatory properties and suppress the development of autoimmune neuroinflammation." Immunology.

Tisato, V., P. Secchiero, E. Rimondi, S. Giancesini, E. Menegatti, F. Casciano, P. Zamboni and G. Zauli (2013). "GM-CSF exhibits anti-inflammatory activity on endothelial cells derived from chronic venous disease patients." Mediators Inflamm **2013**: 561689.

Tomioka, R. and M. Matsui (2014). "Biomarkers for multiple sclerosis." Intern Med **53**(5): 361-365.

Traboulsee, A. L. and D. K. Li (2006). "The role of MRI in the diagnosis of multiple sclerosis." Adv Neurol **98**: 125-146.

Trajkovic, V., S. Stosic-Grujicic, T. Samardzic, M. Markovic, D. Miljkovic, Z. Ramic and M. Mostarica Stojkovic (2001). "Interleukin-17 stimulates inducible nitric oxide synthase activation in rodent astrocytes." J Neuroimmunol **119**(2): 183-191.

Trojano, M., G. Lucchese, G. Graziano, B. V. Taylor, S. Simpson, Jr., V. Lepore, F. Grand'maison, P. Duquette, G. Izquierdo, P. Grammond, M. P. Amato, R. Bergamaschi, G. Giuliani, C. Boz, R. Hupperts, V. Van Pesch, J. Lechner-Scott, E. Cristiano, M. Fiol, C. Oreja-Guevara, M. L. Saladino, F. Verheul, M. Slee, D. Paolicelli, C. Tortorella, M. D'Onghia, P. Iaffaldano, V. Drenzo, H. Butzkueven, M. S. S. Group and M. S. P. S. G. the New Zealand (2012). "Geographical variations in sex ratio trends over time in multiple sclerosis." PLoS One **7**(10): e48078.

Tsiolakidou, G., I. E. Koutroubakis, M. Tzardi and E. A. Kouroumalis (2008). "Increased expression of VEGF and CD146 in patients with inflammatory bowel disease." Dig Liver Dis **40**(8): 673-679.

Tsuge, M., K. Yasui, T. Ichiyawa, Y. Saito, Y. Nagaoka, M. Yashiro, N. Yamashita and T. Morishima (2010). "Increase of tumor necrosis factor-alpha in the blood induces early activation of matrix metalloproteinase-9 in the brain." Microbiol Immunol **54**(7): 417-424.

Tu, T., Q. Gao, Y. Luo, J. Chen, D. Lu, J. Feng, D. Yang, L. Song and X. Yan (2013). "CD146 deletion in the nervous system impairs appetite, locomotor activity and spatial learning in mice." PLoS One **8**(9): e74124.

Tzartos, J. S., M. A. Friese, M. J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M. M. Esiri and L. Fugger (2008). "Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis." Am J Pathol **172**(1): 146-155.

Valmori, D., C. Raffin, I. Raimbaud and M. Ayyoub (2010). "Human ROR γ mat+ TH17 cells preferentially differentiate from naive FOXP3+Treg in the presence of lineage-specific polarizing factors." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(45): 19402-19407.

van Boxel-Dezaire, A. H., M. Smits, S. C. van Trigt-Hoff, J. Killestein, J. C. van Houwelingen, C. H. Polman and L. Nagelkerken (2001). "Cytokine and IL-12 receptor mRNA discriminate between different clinical subtypes in multiple sclerosis." J Neuroimmunol **120**(1-2): 152-160.

van der Goes, A., J. Brouwer, K. Hoekstra, D. Roos, T. K. van den Berg and C. D. Dijkstra (1998). "Reactive oxygen species are required for the phagocytosis of myelin by macrophages." J Neuroimmunol **92**(1-2): 67-75.

Van der Goes, A., D. Wouters, S. M. Van Der Pol, R. Huizinga, E. Ronken, P. Adamson, J. Greenwood, C. D. Dijkstra and H. E. De Vries (2001). "Reactive oxygen species enhance the migration of monocytes across the blood-brain barrier in vitro." FASEB J **15**(10): 1852-1854.

van Horssen, J., M. E. Witte, G. Schreibelt and H. E. de Vries (2011). "Radical changes in multiple sclerosis pathogenesis." Biochim Biophys Acta **1812**(2): 141-150.

van Oosten, B. W., M. Lai, S. Hodgkinson, F. Barkhof, D. H. Miller, I. F. Moseley, A. J. Thompson, P. Rudge, A. McDougall, J. G. McLeod, H. J. Ader and C. H. Polman (1997). "Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial." Neurology **49**(2): 351-357.

Vermersch, P., A. Czlonkowska, L. M. Grimaldi, C. Confavreux, G. Comi, L. Kappos, T. P. Olsson, M. Benamor, D. Bauer, P. Truffinet, M. Church, A. E. Miller, J. S. Wolinsky, M. S. Freedman, P. O'Connor and T. T. G. for the (2013). "Teriflunomide versus subcutaneous interferon beta-1a in patients with relapsing multiple sclerosis: a randomised, controlled phase 3 trial." Mult Scler.

Wade, B. J. (2014). "Spatial analysis of global prevalence of multiple sclerosis suggests need for an updated prevalence scale." Mult Scler Int **2014**: 124578.

Walther, E. U. and R. Hohlfeld (1999). "Multiple sclerosis: side effects of interferon beta therapy and their management." Neurology **53**(8): 1622-1627.

Wang, J., Z. H. Lu, H. J. Gabius, C. Rohowsky-Kochan, R. W. Ledeen and G. Wu (2009). "Cross-linking of GM1 ganglioside by galectin-1 mediates regulatory T cell activity involving

TRPC5 channel activation: possible role in suppressing experimental autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **182**(7): 4036-4045.

Wang, T., R. Allie, K. Conant, N. Haughey, J. Turchan-Chelowo, K. Hahn, A. Rosen, J. Steiner, S. Keswani, M. Jones, P. A. Calabresi and A. Nath (2006). "Granzyme B mediates neurotoxicity through a G-protein-coupled receptor." FASEB J **20**(8): 1209-1211.

Wekerle, H., K. Berer and G. Krishnamoorthy (2013). "Remote control-triggering of brain autoimmune disease in the gut." Curr Opin Immunol **25**(6): 683-689.

Weninger, W., M. Rendl, M. Mildner, C. Mayer, J. Ban, A. Geusau, G. Bayer, A. Tanew, O. Majdic and E. Tschachler (2000). "Keratinocytes express the CD146 (Muc18/S-endo) antigen in tissue culture and during inflammatory skin diseases." J Invest Dermatol **115**(2): 219-224.

Willenborg, D. O., S. Fordham, C. C. Bernard, W. B. Cowden and I. A. Ramshaw (1996). "IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis." J Immunol **157**(8): 3223-3227.

Wong, D. and K. Dorovini-Zis (1992). "Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide." J Neuroimmunol **39**(1-2): 11-21.

Wong, D. and K. Dorovini-Zis (1995). "Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by human brain microvessel endothelial cells in primary culture." Microvasc Res **49**(3): 325-339.

Wong, D., R. Prameya and K. Dorovini-Zis (2007). "Adhesion and migration of polymorphonuclear leukocytes across human brain microvessel endothelial cells are differentially regulated by endothelial cell adhesion molecules and modulate monolayer permeability." J Neuroimmunol **184**(1-2): 136-148.

Wosik, K., K. Biernacki, M. P. Khouzam and A. Prat (2007). "Death receptor expression and function at the human blood brain barrier." J Neurol Sci **259**(1-2): 53-60.

Wosik, K., R. Cayrol, A. Dodelet-Devillers, F. Berthelet, M. Bernard, R. Moundjian, A. Bouthillier, T. L. Reudelhuber and A. Prat (2007). "Angiotensin II controls occludin function and is required for blood brain barrier maintenance: relevance to multiple sclerosis." J Neurosci **27**(34): 9032-9042.

Wu, C., F. Ivars, P. Anderson, R. Hallmann, D. Vestweber, P. Nilsson, H. Robenek, K. Tryggvason, J. Song, E. Korpos, K. Loser, S. Beissert, E. Georges-Labouesse and L. M. Sorokin (2009). "Endothelial basement membrane laminin alpha5 selectively inhibits T lymphocyte extravasation into the brain." Nat Med **15**(5): 519-527.

Wu, C., N. Yosef, T. Thalhamer, C. Zhu, S. Xiao, Y. Kishi, A. Regev and V. K. Kuchroo (2013). "Induction of pathogenic TH17 cells by inducible salt-sensing kinase SGK1." Nature **496**(7446): 513-517.

Yang, H., S. Wang, Z. Liu, M. H. Wu, B. McAlpine, J. Ansel, C. Armstrong and G. Wu (2001). "Isolation and characterization of mouse MUC18 cDNA gene, and correlation of MUC18 expression in mouse melanoma cell lines with metastatic ability." Gene **265**(1-2): 133-145.

Yao, Y., Z. L. Chen, E. H. Norris and S. Strickland (2014). "Astrocytic laminin regulates pericyte differentiation and maintains blood brain barrier integrity." Nat Commun **5**: 3413.

Ye, M., H. M. Sanchez, M. Hultz, Z. Yang, M. Bogorad, A. D. Wong and P. C. Searson (2014). "Brain microvascular endothelial cells resist elongation due to curvature and shear stress." Sci Rep **4**: 4681.

Ye, Z., C. Zhang, T. Tu, M. Sun, D. Liu, D. Lu, J. Feng, D. Yang, F. Liu and X. Yan (2013). "Wnt5a uses CD146 as a receptor to regulate cell motility and convergent extension." Nat Commun **4**: 2803.

Yuan, S., Y. Shi and S. J. Tang (2012). "Wnt signaling in the pathogenesis of multiple sclerosis-associated chronic pain." J Neuroimmune Pharmacol **7**(4): 904-913.

Zeni, P., E. Doepker, U. Schulze-Topphoff, S. Huewel, T. Tenenbaum and H. J. Galla (2007). "MMPs contribute to TNF-alpha-induced alteration of the blood-cerebrospinal fluid barrier in vitro." Am J Physiol Cell Physiol **293**(3): C855-864.

Zhao, J., L. Chen, B. Shu, J. Tang, L. Zhang, J. Xie, S. Qi and Y. Xu (2014). "Granulocyte/Macrophage colony-stimulating factor influences angiogenesis by regulating the coordinated expression of VEGF and the ang/tie system." PLoS One **9**(3): e92691.

Zivadinov, R. and A. Minagar (2009). "Evidence for gray matter pathology in multiple sclerosis: a neuroimaging approach." J Neurol Sci **282**(1-2): 1-4.

Zivadinov, R., B. Weinstock-Guttman, K. Hashmi, N. Abdelrahman, M. Stosic, M. Dwyer, S. Hussein, J. Durfee and M. Ramanathan (2009). "Smoking is associated with increased lesion volumes and brain atrophy in multiple sclerosis." Neurology **73**(7): 504-510.

Zozulya, A. L., E. Reinke, D. C. Baiu, J. Karman, M. Sandor and Z. Fabry (2007). "Dendritic cell transmigration through brain microvessel endothelium is regulated by MIP-1alpha chemokine and matrix metalloproteinases." J Immunol **178**(1): 520-529.

