

Université de Sherbrooke

**Caractérisation d'un Modèle Murin B7.2 Transgénique de
Démýélinisation Spontanée**

Par

Marcel Brisebois

Département de pédiatrie (service d'immunologie)

Thèse présentée à la Faculté de médecine en vue de l'obtention du grade de
philosophiae doctor (Ph.D.) en immunologie

13 Octobre, 2006



Library and
Archives Canada

Bibliothèque et
Archives Canada

Published Heritage
Branch

Direction du
Patrimoine de l'édition

395 Wellington Street
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

395, rue Wellington
Ottawa ON K1A 0N4
Canada

Your file *Votre référence*
ISBN: 978-0-494-25903-0
Our file *Notre référence*
ISBN: 978-0-494-25903-0

NOTICE:

The author has granted a non-exclusive license allowing Library and Archives Canada to reproduce, publish, archive, preserve, conserve, communicate to the public by telecommunication or on the Internet, loan, distribute and sell theses worldwide, for commercial or non-commercial purposes, in microform, paper, electronic and/or any other formats.

The author retains copyright ownership and moral rights in this thesis. Neither the thesis nor substantial extracts from it may be printed or otherwise reproduced without the author's permission.

AVIS:

L'auteur a accordé une licence non exclusive permettant à la Bibliothèque et Archives Canada de reproduire, publier, archiver, sauvegarder, conserver, transmettre au public par télécommunication ou par l'Internet, prêter, distribuer et vendre des thèses partout dans le monde, à des fins commerciales ou autres, sur support microforme, papier, électronique et/ou autres formats.

L'auteur conserve la propriété du droit d'auteur et des droits moraux qui protègent cette thèse. Ni la thèse ni des extraits substantiels de celle-ci ne doivent être imprimés ou autrement reproduits sans son autorisation.

In compliance with the Canadian Privacy Act some supporting forms may have been removed from this thesis.

Conformément à la loi canadienne sur la protection de la vie privée, quelques formulaires secondaires ont été enlevés de cette thèse.

While these forms may be included in the document page count, their removal does not represent any loss of content from the thesis.

Bien que ces formulaires aient inclus dans la pagination, il n'y aura aucun contenu manquant.


Canada

Table des matières

TABLE DES MATIÈRES	I
LISTE DES ILLUSTRATIONS	III
LISTE DES SIGLES ET ABRÉVIATIONS	IV
RÉSUMÉ	VI
1.0 INTRODUCTION	8
1.0.1 LE SYSTÈME DE COSTIMULATION B7/CD28/CTLA-4	8
1.0.2 LA SCLÉROSE EN PLAQUES.....	12
1.0.3 L'IMPLICATION DES AGENTS INFECTIEUX DANS LA PATHOGENÈSE DE LA SCLÉROSE EN PLAQUES ...	14
1.0.4 LE RÔLE DES LYMPHOCYTES T CD4+ DANS LA SCLÉROSE EN PLAQUES ET DANS LES MODÈLES ANIMAUX DE DÉMYÉLINISATION	18
1.0.5 LE RÔLE DES LYMPHOCYTES T CD8+ DANS LA SCLÉROSE EN PLAQUES ET LES MODÈLES ANIMAUX DE DÉMYÉLINISATION.....	22
1.0.6 L'IMPLICATION DU SYSTÈME DE COSTIMULATION B7/CD28 DANS L'AUTOIMMUNITÉ AFFECTANT LE SNC	32
1.0.7 LES CELLULES PRÉSENTATRICES D'ANTIGÈNES AU SNC	34
1.0.8 LES LIGNÉES DE SOURIS TRANSGÉNIQUES QUI EXPRIMENT DE FAÇON CONSTITUTIVE LA MOLÉCULE B7.2 SUR LES LYMPHOCYTES	40
1.0.9 HYPOTHÈSE ET OBJECTIFS	43
2.0 MATÉRIEL ET MÉTHODES	46
2.0.1 SOURIS	46
2.0.2 HISTOLOGIE	46
2.0.3 IMMUNOHISTOCHEMIE	47
2.0.4 IMMUNOFLUORESCENCE	48
2.0.5 COLORATION DE LA MYÉLINE AU BLEU DE TOLUIDINE	49
2.0.6 ISOLATION DES CELLULES À PARTIR DES ORGANES LYMPHOÏDES SECONDAIRES	50
2.0.7 ISOLATION DES CELLULES MONONUCLÉES À PARTIR DU SNC	50
2.0.8 MARQUAGES PHÉNOTYPIQUES AVEC ANTICORPS ET ANALYSE EN CYTOMÉTRIE DE FLUX	51
2.0.9 MARQUAGE INTRACELLULAIRE DE L'IFN γ	52
2.1.0 ISOLATION DE L'ARNm, SYNTHÈSE DE L'ADNC ET PCR	52
2.1.1 ANALYSE DE LA DISTRIBUTION DES TAILLES DU CDR3 DE LA CHAÎNE β DU TCR.....	53
2.1.2 CLONAGE ET SÉQUENÇAGE DES RÉGIONS CDR3 DE LA CHAÎNE β DU TCR	55
3.0 RÉSULTATS (SECTION 1)	56
3.0.1 LES SOURIS B7.2 Tg L31 DÉVELOPPENT DES SYMPTÔMES NEUROLOGIQUES.....	56
3.0.2 INFILTRATS CELLULAIRES ET LÉSIONS DE DÉMYÉLINISATION DANS LE TISSU NERVEUX DES SOURIS B7.2 Tg L31	58
3.0.3 CARACTÉRISATION DE L'INFILTRATION CELLULAIRE AU SYSTÈME NERVEUX	65
3.0.4 LA MOLÉCULE DE COSTIMULATION B7.2 EST EXPRIMÉE DE FAÇON CONSTITUTIVE DANS LE SYSTÈME NERVEUX DES SOURIS B7.2 Tg L31	73
3.0.5 LES LYMPHOCYTES T TRANSGÉNIQUES ET L'EXPRESSION DE LA MOLÉCULE B7.2 DANS LE SYSTÈME NERVEUX SONT REQUIS POUR L'INDUCTION DE LA PATHOLOGIE	77
4.0 RÉSULTATS (SECTION 2)	80
4.0.1 PATHOGENÈSE ACCÉLÉRÉE CHEZ LES SOURIS B7.2 Tg L31 DÉFICIENTES EN CELLULES T CD4+	80
4.0.2 INHIBITION DE LA PATHOGENÈSE CHEZ LES SOURIS B7.2 Tg L31 PAR LA RESTRICTION DU RÉPERTOIRE DES CELLULES T	85
4.0.3 ANALYSE DU RÉPERTOIRE TCR DES CELLULES T CD8+ INFILTRÉES DANS LE SNC DES SOURIS I-A β -/- B7.2 Tg L31	87

4.0.4 L'ÉTAT D'ACTIVATION DE LA MICROGLIE CORRÈLE AVEC L'INDUCTION DE LA PATHOLOGIE CHEZ LES SOURIS B7.2 Tg L31	94
4.0.5 LA SIGNALISATION PAR LE RÉCEPTEUR DE L'IFN γ EST REQUISE POUR L'INDUCTION DE LA PATHOLOGIE CHEZ LES SOURIS B7.2 Tg L31	100
4.0.6 L'ACTIVATION DES CELLULES DE LA MICROGLIE EST DÉPENDANTE DE LA SIGNALISATION DE L'IFN γ CHEZ LES SOURIS B7.2 Tg L31	102
5.0 DISCUSSION	107
5.0.1 EXPRESSION CONSTITUTIVE DE LA MOLÉCULE B7.2 SUR LES CELLULES DE LA MICROGLIE DES SOURIS B7.2 Tg L31	108
5.0.2 L'EXPRESSION DE LIGAND DE COSTIMULATION PAR LES CPAS TISSULAIRES CONDUIT À UNE RÉPONSE AUTOIMMUNE SPÉCIFIQUE À L'ORGANE	112
5.0.3 LES CELLULES DE LA MICROGLIE DES SOURIS B7.2 Tg L31 SONT CAPABLES DE STIMULER DES CELLULES T AUTORÉACTIVES IN VIVO	116
5.0.4 LES CELLULES T CD8 ⁺ SONT LES CELLULES EFFECTRICES CENTRALES DU PROCESSUS DE DÉMYÉLINISATION SPONTANÉE OBSERVÉ.....	117
5.0.5 RÉPERTOIRE DE CELLULES T CD8 ⁺ RETROUVÉ DANS LE SNC DES SOURIS I-A β -/- B7.2 Tg L31 ..	121
5.0.6 ÉVOLUTION DU RÉPERTOIRE DES LYMPHOCYTES T CD8 ⁺ INFILTRANTS LE SNC	126
5.0.7 L'ACTIVATION DES CELLULES DE LA MICROGLIE EST UNE ÉTAPE PRÉCOCE DE LA PATHOGENÈSE CONDUISANT VERS LA DÉMYÉLINISATION CHEZ LES SOURIS B7.2 Tg L31	128
5.0.8 L'ACTIVATION DES CELLULES DE LA MICROGLIE ET LE DÉVELOPPEMENT DES SYMPTÔMES NEUROLOGIQUES REQUIERT LA SIGNALISATION DE L'IFN γ R.....	130
5.0.9 LA PATHOGENÈSE DU PROCESSUS DE DÉMYÉLINISATION SPONTANÉE OBSERVÉE CHEZ LES SOURIS B7.2 Tg L31	134
6.0 CONCLUSION	141
REMERCIEMENTS	142
RÉFÉRENCES.....	143

Liste des illustrations

Figure 1.....	57
Figure 2.....	59
Figure 3.....	60
Figure 4.....	62
Figure 5.....	63
Figure 6.....	64
Figure 7.....	66
Figure 8.....	67
Figure 9.....	68
Figure 10.....	70
Figure 11.....	72
Figure 12.....	74
Figure 13.....	75
Figure 14.....	78
Figure 15.....	82
Figure 16.....	83
Figure 17.....	86
Figure 18.....	89
Figure 19.....	92
Figure 20.....	95
Figure 21.....	97
Figure 22.....	99
Figure 23.....	101
Figure 24.....	103
Figure 25.....	104
Tableau 1	90
Tableau 2	93
Schéma 1.....	136

Liste des sigles et abréviations

ACF	Adjuvant Complet de Freund
C β	Région constante de la chaîne β du TCR
CCPA	Conseil Canadien de Protection des Animaux
CDR3	Troisième Région Hypervariable
CMH	Complexe Majeur d'Histocompatibilité
CPA	Cellule Présentatrice d'Antigènes
CTL	Lymphocyte T cytotoxique
CTLA-4	Cytolytic T Lymphocyte-associated Antigen-4
EAE	Encéphalomyélite Allergique Expérimentale
FACS	Fluorescence Activated Cell Sorter
Hsp60	Protéine chaperonne 60
HHV-6	Virus de l'Herpès Humain 6
IFN γ	Interféron gamma
IFN γ R	Récepteur à l'Interféron gamma
ITAM	Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motifs
LCMV	Virus de la Chorioméningite Lymphocytaire
LPM	Leucoencéphalopathie Progressive Multifocale
MHV	Virus de l'Hépatite Murine
MBP	Protéine Basique de la Myéline
MOG	Glycoprotéine de la Myéline et de l'Oligodendrocyte
NOD	Non Obèse et Diabétique
PAMP	Motif Moléculaire Associé à un Pathogène

LSP	Lymphocyte du Sang Périphérique
PLP	Protéine Protéolipidique
SNP	Système Nerveux Périphérique
RIP	Promoteur à l'Insuline du Rat
RE	Réticulum Endoplasmique
SBA	Sérum Bovin Adulte
SCID	Déficit Immunitaire Combiné Sévère
SNC	Système Nerveux Central
SVF	Sérum de Veau Foetal
TAP	Transporteur Associé à la Maturation de l'Antigène
TCR	Récepteur de la cellule T
Tg	Transgénique
T _H 1	T helper 1
T _H 2	T helper 2
TLR	Récepteur Toll-Like
TMEV-IDD	Démyélinisation Induite par le Virus de Theiler Murin
TNF α	Facteur Nécrosant de Tumeur alpha
TP	Température Pièce
T _R	Cellules T CD4 ⁺ CD25 ⁺ régulatrices
V β	Région variable de la chaîne β du TCR

Résumé

Le but du travail de recherche présenté dans cette thèse était de déterminer les mécanismes impliqués dans le développement de symptômes neurologiques observés dans une lignée de souris transgénique pour l'expression de la molécule B7.2/CD86. La molécule B7.2 est un des ligands du récepteur CD28 qui transmet des signaux intracellulaires nécessaires à la prolifération des lymphocytes T et au développement de leurs fonctions effectrices. Nos travaux démontrent que ces souris développent spontanément une pathologie démyélinisante autoimmune conséquemment à l'expression transgénique de la molécule B7.2 sur les cellules de la microglie du système nerveux central. Les souris affectées présentent une infiltration de lymphocytes T au niveau du système nerveux central et périphérique proximal et cet infiltrat est prédominé par une population de lymphocytes T CD8⁺ mémoires/effectrices. Nos études indiquent que la population de lymphocytes T CD8⁺ joue un rôle effecteur dans le développement de la pathologie tandis que la population des lymphocytes T CD4⁺ la régulent de façon négative. Nos résultats démontrent également que l'activation des cellules de la microglie survient très tôt lors de la pathogenèse et que cette activation des cellules de la microglie ainsi que le processus de démyélinisation sont entièrement dépendants de la signalisation par le récepteur de l'IFN γ .

Ce modèle de démyélinisation reflète l'émergence de cellules T autoréactives spécifiques au système nerveux à partir d'un répertoire périphérique polyclonal, un processus immunopathogénique qui se produit possiblement durant la pathogenèse de la sclérose en plaques. De plus, il présente certaines caractéristiques pathologiques similaires à celles de la sclérose en plaques tels que le développement spontané du

processus de démyélinisation et de dommages aux axones ainsi qu'une connexité avec l'activité de l'IFN γ . Plusieurs données de la littérature suggèrent que les lymphocytes T CD8⁺ pourraient jouer un rôle dans les maladies autoimmunes affectant le système nerveux, mais la contribution exacte et les mécanismes pathogéniques spécifiques des lymphocytes T CD8⁺ ne sont pas encore clairement établis. Le travail de recherche présenté dans cette thèse a donc permis d'établir que la lignée de souris transgénique qui exprime de façon constitutive le ligand de costimulation B7.2/CD86 sur les cellules de la microglie représente un nouveau modèle animal qui permettra d'étudier et de comprendre ces mécanismes pathogéniques spécifiques aux lymphocytes T CD8⁺ ainsi que les processus qui régulent la participation des lymphocytes T CD8⁺ dans la destruction de la gaine de myéline.

Mots clés: lymphocyte T CD8⁺, démyélinisation, costimulation, autoimmunité, sclérose en plaques.

1.0 Introduction

1.0.1 Le système de costimulation B7/CD28/CTLA-4

En plus de la reconnaissance d'un peptide antigénique par leur TCR, les réponses des lymphocytes T dépendent des signaux de costimulation produits par l'interaction du récepteur CD28 avec ses ligands B7.1 (CD80) et B7.2 (CD86) exprimés à la surface des CPAs. Ce deuxième signal prévient notamment l'activation incontrôlée des cellules T face aux antigènes du soi présentés par les cellules somatiques et est proposé comme un mécanisme prévenant l'autoimmunité. Exprimée par les cellules T naïves et les cellules T activées, la glycoprotéine CD28 est le récepteur de costimulation le mieux caractérisé. En absence de stimulation du récepteur CD28, la liaison du TCR pousse la cellule T vers un état apoptotique ou anergique. Les signaux produits par la stimulation du récepteur CD28 augmentent l'expression d'homologues Bcl-2 anti-apoptotiques comme Bcl-X_L, augmentant les signaux de survie (Boise L. H. et al. 1995) et prévient également l'état anergique (Harding F. A. et al. 1992). Le récepteur CD28 transmet aussi un signal qui stimule la production de cytokines comme l'IL-2 et l'IFN γ en augmentant l'activité de transcription et la stabilisation de ces ARN messagers (Lindstein T. et al. 1989, Thompson C. B. et al. 1989). Il a également été démontré que la liaison de CD28 abaisse le seuil d'activation des lymphocytes T en réduisant le nombre de molécules de TCR qui doivent lier un épitope antigénique afin de conduire à la production de cytokines et à la prolifération des lymphocytes T (Itoh Y. et al. 1997, Viola A. et al. 1996). L'importance de la costimulation par le récepteur CD28 dans les réponses immunitaires *in vivo* est démontrée chez la souris CD28 *-/-* ou chez les souris traitées avec des antagonistes de

l'interaction CD28 avec ses ligands B7.1/B7.2. Ces souris montrent une réponse immunitaire réduite à des pathogènes infectieux (Compton H. L. et al. 2002, Mittrucker H. W. et al. 2001, Shahinian A. et al. 1993) et à des alloantigènes (Salomon B. et al. 2001). Un défaut au niveau de la signalisation de CD28 affecte tant l'immunité humorale que l'immunité cellulaire (Borriello F., Sethna, M. P., Boyd, S. D., Schweitzer, N. A., Tivol, E. A., Jacoby, D., Strom, T. B., Simpson, E. M., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. 1997, Kearney E. R. et al. 1995, Lenschow D. J. et al. 1995). On sait que la liaison de CD28 active les facteurs de transcription NF- κ B (Kane L. P. et al. 2002), NFAT (Michel F. et al. 2000) et AP-1 (Rincon M. et al. 1994) qui régulent la prolifération, la différenciation et la survie cellulaire. Le TCR et le récepteur CD28 constituent des unités de signalisation indépendantes dont les éléments proximaux diffèrent grandement, notamment au niveau des queues cytoplasmiques qui permettent la connexion du récepteur avec la machinerie de signalisation intracellulaire. Le TCR transmet un signal par l'entremise de ses dix "immunoreceptor tyrosine-based activation motifs" (ITAMs) distribués sur les 6 sous-unités CD3 ζ (Samelson L. E. 2002) tandis que le signal du récepteur CD28 est plutôt transmis par des tyrosines phosphorylées et des domaines riches en prolines (Ward S. G. 1996). Même si les deux récepteurs utilisent les mêmes protéine tyrosine kinases pour la phosphorylation de tyrosines de leur queue cytoplasmique respective, la stimulation du récepteur CD28 n'active ni ZAP70 ni la formation du complexe LAT-SLP76. Malgré ces différences de signalisation majeures, différentes études indiquent que la signalisation par le récepteur CD28 contribue de plusieurs façons au signal dérivé du TCR. Premièrement, il y a quelques éléments de signalisation qui sont communs au TCR et au récepteur CD28, notamment PI3K (Rudd

C. E. 1996) et Vav1 (Klasen S. et al. 1998, Michel F. et al. 1998), qui suggèrent que la signalisation du récepteur CD28 pourrait directement renforcer le signal du TCR ou faciliter l'établissement de sa chaîne de signalisation (Michel F. et al. 2001). Parce que le récepteur CD28 co-localise avec le TCR à la synapse immune (Grakoui A. et al. 1999) et que la stœchiométrie d'engagement favorise fortement l'interaction du récepteur CD28 avec ses ligands B7.1/B7.2 par rapport à l'interaction TCR-CMH (de 100 à 1000 fois plus de ligands disponibles pour le récepteur CD28), il a été proposé que la liaison du récepteur CD28 avec ses ligands B7.1/B7.2 favoriserait la juxtaposition de la cellule T et la CPA, favorisant et prolongeant d'autant la stimulation du TCR (Acuto O. et al. 2003).

Le "Cytolytic T Lymphocyte-associated Antigen-4" (CTLA-4/CD152) (Brunet J. F. et al. 1987) est un récepteur capable de lier les molécules B7.1 et B7.2 et qui possède environ 30% d'homologie avec CD28. CTLA-4 est exprimé par les cellules T activées (Alegre M. L. et al. 1996, Walunas T. L. et al. 1994). Son expression est principalement restreinte au compartiment intracellulaire, les molécules CTLA-4 exprimées à la surface étant rapidement recyclées par endocytose (Chuang E. et al. 1997, Zhang Y. et al. 1997). CTLA-4 est un récepteur qui régule négativement l'activation lymphocytaire lors de sa liaison avec l'un de ses ligands (Brunner M. C. et al. 1999, Walunas T. L. et al. 1994) notamment en réduisant la production d'IL-2, en réduisant l'expression du récepteur à l'IL-2 et en bloquant les cellules T en phase G1 du cycle cellulaire (Krummel M. F. et al. 1995, Walunas T. L. et al. 1994). L'importance du rôle de régulateur négatif de l'activation des cellules T joué par CTLA-4 a été démontré *in vivo* avec la souris CTLA-4^{-/-} qui est affligée d'un syndrome de lymphoprolifération aigüe menant à une accumulation de lymphocytes T dans les organes périphériques qui est fatale en 3-5

semaines (Tivol E. A. et al. 1995). CTLA-4 a une affinité supérieure pour les ligands B7 comparativement à CD28 (Collins A. V. et al. 2002, Linsley P. S. et al. 1994). De plus, chaque dimère CTLA-4 peut lier deux molécules B7.1 ou B7.2 comparativement à une seule pour le dimère CD28 (Collins A. V. et al. 2002). La molécule B7.1 est exprimée sous forme de dimère à la surface tandis que la molécule B7.2 est exprimée sous forme de monomère (Ikemizu S. et al. 2000, Schwartz J. C. et al. 2001). Cette différence structurale pourrait expliquer pourquoi les molécules B7.2 et B7.1 recrutent respectivement CD28 et CTLA-4 à la synapse immune (Pentcheva-Hoang T. et al. 2004).

La glycoprotéine B7.1 est le premier ligand du récepteur CD28 à avoir été cloné (Freeman G. J. et al. 1991). Il est exprimé sur les cellules B et T activées, les monocytes stimulés à l'IFN γ , les cellules dendritiques (Azuma M. et al. 1993) et les macrophages (Hathcock K. S. et al. 1994). Une étude a rapporté que l'utilisation d'un anticorps anti-B7.1 ne pouvait bloquer complètement l'activation des lymphocytes T par des lymphocytes B activés et a rapporté la présence d'un ligand additionnel pour CTLA-4 sur les cellules B activées, la molécule B7.2 (Lenschow D. J. et al. 1993). Le clonage de la molécule B7.2 murine a démontré que la molécule B7.2 ne partageait que 25% d'homologie au niveau de la séquence peptidique avec son homologue B7.1 (Chen C. et al. 1994, Freeman G. J. et al. 1993). Un faible niveau d'expression de la molécule B7.2 est détecté sur les cellules dendritiques (Azuma M. et al. 1993), les macrophages (Hathcock K. S. et al. 1994) et contrairement à B7.1, sur les cellules T et B naïves murines. Le niveau d'expression de la molécule B7.2 est supérieur à celui de la molécule B7.1 sur les CPAs suite à leur activation et cette expression de la molécule B7.2 survient également plus rapidement que celle de la molécule B7.1, ce qui suggère que la molécule

B7.2 serait le ligand du récepteur CD28 impliqué lors de l'initiation d'une réponse immune (Hathcock K. S. et al. 1994, Inaba K. et al. 1994).

1.0.2 La sclérose en plaques

Parmi les différentes maladies affectant le système nerveux central (SNC), la sclérose en plaques est la pathologie autoimmune la plus commune. La sclérose en plaques affecte environ 400 000 nord-américains et autant d'européens (Sospedra M. et al. 2005) et il n'y a présentement aucun traitement curatif disponible. La majorité des personnes atteintes sont âgées entre 20 et 40 ans, parmi lesquelles on retrouve plus de femmes que d'hommes (ratio 1.6 : 1) (Beeson P. B. 1994). Les principaux symptômes observés chez les patients incluent des troubles visuels, une fatigabilité extrême, des troubles de l'équilibre et de coordination, des raideurs musculaires, de la faiblesse aux membres inférieurs et une altération de la sensibilité (Noseworthy J. H. et al. 2000). Les symptômes sont causés par une démyélinisation progressive des axones au système nerveux central, ce qui altère ou bloque l'influx nerveux (Noseworthy J. H. et al. 2000). La myéline est un composé protéolipidique qui forme une gaine isolante autour des fibres nerveuses. La myéline est produite par les oligodendrocytes du SNC et par les cellules de Schwann du système nerveux périphérique (SNP). Des dommages axonaux peuvent s'ajouter aux lésions de démyélinisation et engendrer des déficits neurologiques permanents dont les symptômes varient selon les régions touchées (Bitsch A. et al. 2000). Trois principales formes de sclérose en plaques ont été définies selon le rythme d'évolution des symptômes (Noseworthy J. H. et al. 2000, Sospedra M. et al. 2005). La forme cyclique est caractérisée par des poussées symptomatiques clairement définies

suivies de rémissions partielles ou complètes. La forme progressive primaire est caractérisée par une aggravation continue des symptômes sans rémission évidente. Finalement, la forme progressive secondaire affecte la moitié des patients atteints par la forme cyclique qui voient soudainement leur état s'aggraver de façon progressive. L'étiologie de la sclérose en plaques est encore inconnue et la pathogenèse n'est pas encore complètement caractérisée, mais plusieurs observations laissent croire que la sclérose en plaques a une origine autoimmune. Les lésions de démyélinisation sont associées à des infiltrats leucocytaires qui incluent des lymphocytes T ($CD4^+$ et $CD8^+$), des lymphocytes B et des macrophages (Hauser S. L. et al. 1986, Prineas J. W. et al. 1978, Traugott U. et al. 1983). L'hypothèse la plus répandue suggère que des lymphocytes T autoréactifs reconnaissent une ou des composantes de la myéline, s'activent et recrutent des macrophages qui causeront le dommage à la gaine de myéline chez une personne génétiquement prédisposée. Le ou les événements initiateurs sont encore inconnus mais des facteurs environnementaux comme les infections sont fortement envisagés (Marrie R. A. 2004) et sont abordés à la section 1.0.6. La sclérose en plaques est une maladie dont l'évolution clinique et la réponse aux différentes thérapies sont très hétérogènes (Sospedra M. et al. 2005). Au niveau pathologique, la sclérose en plaques a été divisée en quatre sous-groupes par des chercheurs qui ont identifié quatre types de patrons de démyélinisation qui diffèrent par l'association relative des lésions avec les cellules T et B, les anticorps, le complément, la perte de myéline et l'apoptose des oligodendrocytes (Lucchinetti C. et al. 2000). Ils ont également démontré que les lésions de démyélinisation retrouvées chez un même patient sont très homogènes (Lucchinetti C. et al. 2000). Ces observations suggèrent qu'il existe potentiellement

plusieurs processus pathogéniques qui peuvent conduire au développement de la sclérose en plaques.

1.0.3 L'implication des agents infectieux dans la pathogenèse de la sclérose en plaques

Il a été suggéré que la pathogenèse de la sclérose en plaques serait associée à une infection virale. Cette théorie provient principalement du fait que la sclérose en plaques n'est pas une maladie dont les facteurs sont uniquement génétiques. En effet, les études épidémiologiques conduites chez les jumeaux révèlent que 30% des paires de jumeaux monozygotiques développent la pathologie comparativement à 4% chez les paires de jumeaux dizygotiques (Spielman R. S. et al. 1982, Willer C. J. et al. 2003). Même si cette fréquence d'association démontre qu'il y a une composante génétique importante à la susceptibilité à la sclérose en plaques, elle suggère également que d'autres facteurs apportent une contribution majeure. Des facteurs environnementaux comme les pathogènes sont les plus susceptibles d'expliquer la disparité du développement de la sclérose en plaques chez les jumeaux monozygotiques et cette hypothèse est supportée par l'observation générale que les rechutes des patients atteints de sclérose en plaques suivent temporellement une infection cliniquement diagnostiquée (Sibley W. A. et al. 1985). Différents modèles animaux supportent également l'implication possible d'un virus dans la MS. Les résultats obtenus avec le modèle animal de démyélinisation induite par le virus TMEV-IDD démontrent qu'il est possible que des dommages tissulaires initiaux causés par une infection persistante au SNC puissent engendrer la présentation subséquente d'autoantigènes et l'activation de cellules T autoréactives dans un

environnement inflammatoire au SNC, menant ainsi à une démyélinisation étendue. Dans un modèle EAE transgénique pour un TCR spécifique à la protéine MBP, il a été observé que le développement spontané de démyélinisation chez ces animaux requérait l'hébergement de la colonie dans des animaleries qui n'étaient pas totalement exemptes de germes (Goverman J. et al. 1993), ce qui suggère une association entre les pathogènes environnementaux et la susceptibilité à la démyélinisation spontanée dans ce modèle.

Des efforts énormes ont été mis de l'avant pour identifier un pathogène commun à tous les patients atteints de la sclérose en plaques. Le virus de l'herpès humain 6 (HHV-6) (Challoner P. B. et al. 1995, Cuomo L. et al. 2001), le virus d'Epstein-Barr (EBV) (Ascherio A. et al. 2000), les coronavirus humains 229E et OC43 (Dessau R. B. et al. 2001, Murray R. S. et al. 1992, Stewart J. N. et al. 1992) et même des rétrovirus sexuellement transmissibles comme le virus HTLV-1 (Ehrlich G. D. et al. 1991) ont tous été l'objet d'une ou plusieurs études. Jusqu'à ce jour cependant, il n'y a pas de preuves suffisantes supportant l'existence d'un virus unique et commun qui pourrait directement être associé à tous les cas de sclérose en plaques. L'ensemble des données recueillies lors des différentes études qui ont échoué à identifier un pathogène spécifique à la sclérose en plaques suggère cependant que différents candidats pathogéniques puissent participer à l'initiation ou à la progression de la sclérose en plaques selon la prédisposition génétique particulière de chaque individu.

Trois mécanismes ont été proposés pour décrire comment une infection par un pathogène peut potentiellement mener à la démyélinisation au SNC: une lyse virale directe des oligodendrocytes infectés, une réponse immunopathologique initialement dirigée vers le pathogène puis déviée vers le soi pour causer la démyélinisation (mimétisme

moléculaire), ou encore l'activation de cellules T autoréactives suite à la présentation d'épitopes du soi endogènes ou acquis par les CPAs résidentes dans un contexte inflammatoire au SNC suite à l'infection (activation secondaire combinée à la dégénérescence épitopique). Peu de données supportent une infection et une lyse subséquentes des oligodendrocytes. Le papovirus qui cause la leucoencéphalopathie progressive multifocale (LPM) est un virus capable de causer une démyélinisation directe suite à l'infection des oligodendrocytes humains (Padgett B. L. et al. 1971). Il a été également démontré que l'expression de gènes de rétrovirus endogènes humains comme le gène HERV-W *env* qui encode la glycoprotéine syncytine est augmentée dans les astrocytes et les cellules de la microglie dans les lésions de sclérose en plaques (Antony J. M. et al. 2004). Le surnageant de cultures d'astrocytes qui exprime la glycoprotéine syncytine cause une mort des oligodendrocytes mais n'affecte pas les neurones sous des conditions similaires et l'augmentation de l'expression de syncytine in vivo par les astrocytes et les cellules de la microglie affecte la myéline et réduit le nombre d'oligodendrocytes détectables dans les souris CD-1 (Antony J. M. et al. 2004).

Le mimétisme moléculaire est une démonstration de réactivité croisée de la part des cellules T entre des pathogènes et des autoantigènes. Ces cellules T posséderaient une affinité intermédiaire pour des neuroantigènes du soi, une affinité qui remplit les conditions nécessaires à la sélection thymique et à la migration de ces cellules T potentiellement autoréactives aux organes lymphoïdes secondaires. La spécificité de ces cellules T autoréactives pour un antigène dérivé d'un pathogène entraînerait une réponse croisée contre le pathogène et le soi lors d'une infection ultérieure. Le principe de ce mécanisme a été démontré par l'infection de souris SJL/J avec un virus TMEV non

pathogénique et modifié pour exprimer soit un peptide du soi (le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁) tiré de la neuro-protéine PLP ou une séquence mimique (HI₅₇₄₋₅₈₆) provenant de la protéine naturellement encodée lors d'une infection par *Haemophilus influenzae* et qui partage seulement 6 de ses 13 acides aminés avec la séquence PLP₁₃₉₋₁₅₁ (Olson J. K. et al. 2001). Le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ est l'épitope dominant de la réponse autoimmune du modèle TMEV-IDD et l'expression du peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁ par le virus modifié résulte en une démyélinisation accélérée comparativement au virus original. Le point marquant de l'étude est que les souris infectées avec le virus TMEV-HI₅₇₄₋₅₈₆ développent une démyélinisation accélérée qui est associée à la production d'une réponse de cellules CD4⁺ autoréactives capables de répondre au deux peptides. Une autre conséquence possible d'une infection virale au SNC est de stimuler les capacités de présentation et de costimulation des CPA's résidentes qui présentent des antigènes viraux et des antigènes du soi (suite à leur infection directe et/ou suite à l'acquisition de débris apoptotiques provenant de cellules infectées et détruites). Les CPA's activées stimuleraient ainsi la réponse de cellules T spécifiques non seulement aux épitopes viraux mais briseraient également l'état de tolérance de cellules T autoréactives. Une fois la destruction de la gaine de myéline entamée, les CPA's présenteraient une variété et une concentration accrues d'antigènes du soi permettant l'activation d'autant plus de cellules T autoréactives (dégénérescence épitopique). De plus, si l'infection du SNC induit l'activation des CPA's tissulaires et l'expression de molécules de costimulation, il est possible que des cellules T autoréactives recrutées non spécifiquement retrouvent sur place leur autoantigène spécifique ainsi que les conditions costimulatoires nécessaires au bris de leur tolérance.

1.0.4 Le rôle des lymphocytes T CD4⁺ dans la sclérose en plaques et dans les modèles animaux de démyélinisation

Les cellules T CD4⁺ ont longtemps été considérées comme la population lymphocytaire responsable des dommages observés chez les patients atteints de sclérose en plaques pour deux principales raisons: les modèles animaux utilisés et les études génétiques. La plupart des études utilisant l'encéphalomyélite allergique expérimentale (EAE) comme modèle ont visé le rôle des lymphocytes T CD4⁺ et ce, suite à une étude pionnière qui a démontré que le transfert adoptif de clones de cellules T CD4⁺ T_H1 spécifiques à des composantes de la myéline étaient suffisants pour transférer la pathologie chez un animal receveur (Ben-Nun A. et al. 1983). L'hypothèse du rôle exclusif des cellules T CD4⁺ autoréactives dans la sclérose en plaques a également été soutenue par des études génétiques qui ont établi que l'allèle HLA-DR2 du CMH II était un facteur indépendant de risque pour le développement de la sclérose en plaques (Kalman B. et al. 1999, Olerup O. et al. 1991). De plus, on a trouvé des épitopes immunodominants de la MBP complexés avec HLA-DR2 dans les lésions actives de patients atteints de sclérose en plaques (Krogsgaard M. et al. 2000).

Les mécanismes de tolérance centrale thymique permettent l'élimination de la majorité des cellules T ayant une affinité élevée pour les autoantigènes, mais ne sont pas parfaits (Kappler J. W. et al. 1987), notamment parce que l'expression de certains autoantigènes est restreinte à des tissus périphériques spécifiques (Hanahan D. 1998). C'est pourquoi l'activation des cellules T est assujettie à des processus précis et à des mécanismes régulateurs qui maintiennent un état de tolérance. Une fois activés, les

lymphocytes T suivront une suite d'évènements séquentiels de différenciation. L'expansion initiale sera composée majoritairement de cellules effectrices dont la majorité seront éliminées lors de la phase de contraction laissant place à une population stable de cellules mémoires prêtes pour une réponse rapide à un challenge antigénique ultérieur (Sprent J. et al. 2002). De façon générale, les cellules T CD4⁺ reconnaissent les peptides présentés par le complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH II) qui sont exprimés par les CPAs professionnelles. Ces peptides sont généralement dérivés d'antigènes exogènes acquis par la CPA. Suite à la stimulation du récepteur de la cellule T (TCR) par le complexe antigène/CMH II en combinaison avec les signaux de co-stimulation requis (voir section 1.0.1), les lymphocytes T CD4⁺ ont la capacité de se différencier en trois sous-populations; les lymphocytes CD4⁺ T_H1 et T_H2 (Mosmann T. R. et al. 1986) et les lymphocytes CD4⁺ T_HIL-17 (Langrish C. L. et al. 2005). Les lymphocytes T CD4⁺ pro-inflammatoires T_H1 produisent principalement les cytokines IFN γ et TNF α , des cytokines importantes pour l'immunité cellulaire. Pour leur part, les lymphocytes T CD4⁺ T_H2 produisent principalement de l'IL-4 et de l'IL-5 qui favorisent l'immunité humorale. Finalement, les lymphocytes T CD4⁺ T_HIL-17 produisent de l'IL-17, de l'IL-17F, de l'IL-6 et du TNF et forment une sous-population de cellules T CD4⁺ pathogéniques dans l'EAE (Langrish C. L. et al. 2005).

Étant donné les moyens restreints disponibles permettant l'étude des mécanismes fondamentaux régissant la sclérose en plaques chez l'humain, différents modèles animaux ont été développés. L'EAE est un modèle animal qui partage des similarités avec la sclérose en plaques (Olitsky P. K. et al. 1949). L'EAE est induite par l'immunisation d'animaux (souris et rats sont les espèces les plus fréquemment utilisées)

avec des composantes de la myéline du SNC en présence d'adjuvant complet de Freund (ACF) ou par le transfert adoptif de lymphocytes T CD4⁺ T_H1 spécifiques à ces diverses composantes neuro-protéiques (Ben-Nun A. et al. 1983, Ben-Nun A. et al. 1981). Les lésions se situent surtout au niveau de la moelle épinière (Martin R. et al. 1992, Owens T. et al. 1995) et des dommages aux axones sont également observés (Pitt D. et al. 2000). Ce sont les cellules T CD4⁺ qui sont encéphalitogéniques dans presque tous les modèles EAE excepté pour deux modèles où les cellules T CD8⁺ transfèrent la pathologie (Ford M. L. et al. 2005, Huseby E. S. et al. 2001, Sun D. et al. 2001). Il y a trois composantes protéiques majeures de la myéline qui sont fréquemment utilisées dans les différents modèles EAE sous forme de protéines complètes ou fragments peptidiques: la protéine basique de la myéline (MBP), la protéine protéolipidique (PLP) et la glycoprotéine de la myéline et de l'oligodendrocyte (MOG). Selon la protéine et la souche de souris utilisées, on peut observer trois formes de pathologie démyélinisante: la forme aiguë qui est suivie d'une rémission complète, la forme cyclique dans laquelle les phases symptomatiques et asymptomatiques alternent et finalement la forme chronique où les symptômes s'aggravent progressivement (Fuller K. G. et al. 2004). Les principaux symptômes incluent une perte de tonus au niveau de la queue et une faiblesse des membres inférieurs qui se développe en paralysie partielle puis complète.

Il existe également des modèles animaux de démyélinisation induits par les virus. La démyélinisation induite par le virus de Theiler murin (TMEV-IDD) (Dal Canto M. C. et al. 1977) consiste à infecter une espèce susceptible, comme la souris SJL/J, de façon intracrâniale avec le virus TMEV qui infecte principalement les cellules présentatrices d'antigènes (CPAs) (macrophages périvasculaires et cellules de la microglie) du SNC

(Clatch R. J. et al. 1990) et qui engendre une pathologie démyélinisante induite par les cellules T CD4⁺ (Katz-Levy Y. et al. 2000). La démyélinisation est initiée par les cellules T CD4⁺ spécifiques au virus persistant au SNC puis est amplifiée par une réponse secondaire des cellules T CD4⁺ périphériques à des épitopes de la myéline libérés suite à la démyélinisation initiale. Cette réponse autoimmune secondaire se développe durant la progression de la pathologie en commençant par une réponse spécifique de cellules T CD4⁺ contre un épitope dominant de la myéline (le peptide PLP₁₃₉₋₁₅₁) (Katz-Levy Y. et al. 2000, Miller S. D. et al. 1997). Cette réponse de cellules T CD4⁺ encéphalitogéniques se diversifie ensuite pour répondre à une variété d'épitopes de la myéline moins dominants (le peptide PLP₁₇₈₋₁₉₁, le peptide PLP₅₆₋₇₀ et le peptide MOG₉₂₋₁₀₆) (Vanderlugt C. L. et al. 2002). La réponse des cellules T CD4⁺ autoréactives est stimulée en partie par l'acquisition de débris de la myéline et la présentation subséquente de peptides de la myéline par les CPAs résidentes au SNC (Katz-Levy Y. et al. 1999).

L'infection intracrâniale de souris C57BL/6 par la souche A59 du virus de l'hépatite murine (MHV) (Lavi E. et al. 1984) ou de souris BALB/c par le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV) (Gilden D. H. et al. 1972) induisent également la démyélinisation au SNC. Dans le modèle LCMV, les dommages à la gaine de myéline sont induits par la réponse immune puisqu'en absence de cellules T, les souris infectées ne développent aucune pathologie neurologique (Rowe W. P. et al. 1963). Similairement, les souris immunodéficientes sont très résistantes à la démyélinisation induite par le MHV (Houtman J. J. et al. 1996, Wu G. F. et al. 1999).

1.0.5 Le rôle des lymphocytes T CD8⁺ dans la sclérose en plaques et les modèles animaux de démyélinisation

Si la documentation scientifique sur l'important rôle des cellules T CD4⁺ dans les modèles animaux de démyélinisation et dans la sclérose en plaques est abondante, celle traitant du rôle des cellules T CD8⁺ dans ces pathologies l'est beaucoup moins. Même si il a été démontré il y a près de vingt ans que les cellules T CD8⁺ dominent les lésions actives chez les patients atteints de sclérose en plaques (Hauser S. L. et al. 1986), c'est durant les cinq dernières années que se sont accumulées la plupart des études qui suggèrent un rôle important des cellules T CD8⁺ dans la pathogenèse de la sclérose en plaques et le modèle animal EAE.

L'activation de cellules T CD8⁺ naïves nécessite la stimulation du TCR via un complexe peptide/CMH I présenté par une CPA professionnelle, stimulation reçue en combinaison avec des signaux costimulateurs. Une fois activées, les cellules T CD8⁺ se différencient en cellules T CD8⁺ effectrices T_{C1} (Sad S. et al. 1995), qui produisent principalement de l'IFN γ , du TNF α et qui démontrent les meilleures fonctions cytotoxiques (Kemp R. A. et al. 2001), ou en cellules effectrices T_{C2} qui produisent principalement de l'IL-4, de l'IL-5 et de l'IL-10 (Li L. et al. 1997, Sad S. et al. 1995). Plusieurs études ont démontré que l'aide des lymphocytes T CD4⁺ était également nécessaire pour la réponse des lymphocytes T CD8⁺ naïves à un antigène lors de conditions non inflammatoires (Bennett S. R. et al. 1998, Ridge J. P. et al. 1998, Schoenberger S. P. et al. 1998). Dans ce contexte particulier, l'aide de la cellule T CD4⁺ se traduirait par l'activation de la CPA, notamment via l'interaction CD40L-CD40 (Lanzavecchia A. 1998). Les cellules T CD4⁺ CD40L⁺ activées stimulent les CPAs

exprimant CD40. Suite à cette activation, les CPAs augmentent le niveau d'expression des molécules de CMH I et II, celui des molécules de costimulation B7.1 et B7.2 et produisent de l'IL-12 (Caux C. et al. 1994, Cella M. et al. 1996, Sallusto F. et al. 1994), une importante cytokine pour l'expansion clonale des T CD8⁺ naïves (Valenzuela J. et al. 2002). Il a été démontré qu'en absence de CPAs exprimant CD40, les cellules T CD4⁺ CD40L⁺ peuvent fournir directement de l'aide aux cellules T CD8⁺ exprimant CD40 (Bourgeois C. et al. 2002). D'autre part, et fait important, l'aide apportée par la cellule T CD4⁺ à l'activation des cellules T CD8⁺ serait facultative si la CPA est suffisamment conditionnée par un environnement inflammatoire, par des signaux dérivés d'un pathogène ou encore par la stimulation artificielle du récepteur CD40 (Bennett S. R. et al. 1998, Ridge J. P. et al. 1998, Schoenberger S. P. et al. 1998). On retrouve donc deux principaux contextes d'activation pour les lymphocytes T CD8⁺ qui diffèrent seulement par les événements responsables du conditionnement des CPAs. Dans la première situation, les signaux envoyés par le pathogène ou l'antigène ne sont pas suffisants pour activer les CPAs et l'activation spécifique des cellules T CD8⁺ sera dépendante de l'aide des cellules T CD4⁺. Cependant, la plupart des infections ou environnements inflammatoires fourniraient les signaux nécessaires au conditionnement/activation des CPAs qui engageront la réponse primaire des cellules T CD8⁺ indépendamment de l'aide des cellules T CD4⁺ (Buller R. M. et al. 1987, Liu Y. et al. 1989, Nash A. A. et al. 1987, Ridge J. P. et al. 1998, Sparwasser T. et al. 2000). Un des atouts principal de la réponse adaptative est sa capacité à répondre plus efficacement à un deuxième challenge du même pathogène grâce à la population de lymphocytes mémoires formée lors de la réponse initiale. Il a été démontré par trois groupes indépendants que suite à une réponse

primaire efficace des lymphocytes T CD8⁺ sans le soutien des lymphocytes T CD4⁺, la réponse secondaire des lymphocytes T CD8⁺ est compromise en absence des cellules T CD4⁺ (Belz G. T. et al. 2002, Janssen E. M. et al. 2003, Shedlock D. J. et al. 2003, Sun J. C. et al. 2003). Ces expériences conduites avec différents pathogènes tel le virus de la chorioméningite lymphocytaire (LCMV), le virus de l'influenza et *Listeria monocytogenes* démontrent l'important rôle joué par les cellules T CD4⁺ dans la génération et le maintien des cellules T CD8⁺ mémoires.

Il y a maintenant des preuves directes que les cellules T CD8⁺ peuvent induire le développement d'une autoimmunité destructive au SNC. En effet, trois groupes indépendants ont récemment démontré que le transfert adoptif de lymphocytes T CD8⁺ activés spécifiques à des peptides de la myéline était suffisant au déclenchement de l'EAE chez les souris receveuses (Ford M. L. et al. 2005, Huseby E. S. et al. 2001, Sun D. et al. 2001) Le modèle développé par Huseby et al. consiste à isoler des lymphocytes T CD8⁺ de ganglions lymphatiques de souris C3H immunisées avec le peptide MBP₇₉₋₈₇ et de les re-stimuler *in vitro* en présence d'IL-2 avant leur transfert à des souris receveuses. Le transfert des cellules T CD8⁺ induit une pathologie sévère avec une haute incidence de mortalité chez les souris receveuses avec des symptômes neurologiques comme l'ataxie, des réflexes spastiques et des pertes de coordination. La nature des symptômes neurologiques et le rythme du développement clinique dans ce modèle diffèrent de la paralysie ascendante qui est observée dans le modèle EAE classique. L'analyse de la distribution et du type de lésions dans le modèle de Huseby et al. révèle d'autres différences entre cette pathologie démyélinisante induite par les cellules T CD8⁺ et l'EAE classique. Les lésions induites par les cellules T CD8⁺ spécifiques pour le

peptide MBP₇₉₋₈₇ sont restreintes au cerveau, notamment au niveau du cervelet, du bulbe rachidien et du cortex cérébral. Aucune lésion n'a été observée au niveau de la moelle épinière des souris symptomatiques ayant reçu des cellules T CD8⁺ spécifiques, ce qui diffère de l'EAE classique dans laquelle les lésions se retrouvent principalement au niveau de la moelle épinière (Martin R. et al. 1992). Deux groupes ont démontré que le transfert de cellules T CD8⁺ spécifiques pour le peptide MOG₃₅₋₅₅ à des souris C57BL/6 ou C57BL/6 SCID (déficit immunitaire combiné sévère) était capable d'induire une pathologie neurologique dont l'incidence et la sévérité des symptômes étaient comparables à ceux obtenus par le transfert de cellules T CD4⁺ spécifiques pour le peptide MOG₃₅₋₅₅ aux mêmes types de souris receveuses (Ford M. L. et al. 2005, Sun D. et al. 2001). Les souris C57BL/6 déficientes pour le gène de la β_2 -microglobuline sont résistantes à la démyélinisation induite par le transfert de cellules T CD8⁺ spécifiques pour le peptide MOG₃₅₋₅₅, suggérant que les cellules T CD8⁺ effectrices nécessitent l'expression de molécules du CMH I intactes pour exercer leurs activités encéphalitogéniques (Sun D. et al. 2001). L'analyse histopathologique des lésions a révélé que l'activité inflammatoire et les zones de démyélinisation se retrouvent au cerveau et à la moelle épinière (Sun D. et al. 2001). Les infiltrats cellulaires au niveau des lésions sont composés majoritairement de neutrophiles et de larges cellules mononucléaires avec très peu de lymphocytes T (Sun D. et al. 2001). Cependant, le marquage des cellules T CD8⁺ encéphalitogéniques avec le tétramère MOG₃₇₋₅₀:H-2D^b a démontré qu'il y a accumulation de cellules T CD8⁺ encéphalitogéniques au SNC avant les premiers signes cliniques et que ces cellules encéphalitogéniques sécrètent de l'IFN γ mais pas de TGF β ou d'IL-10 (Ford M. L. et al. 2005).

Le rôle des cellules T CD8⁺ a également été étudié dans des modèles animaux de démyélinisation induits par des virus. Même si les deux sous-populations lymphocytaires CD8⁺ et CD4⁺ peuvent être des cellules effectrices lors de démyélinisation induite par LCMV (Dixon J. E. et al. 1987, Doherty P. C. et al. 1988, Quinn D. G. et al. 1993), ce sont les cellules T CD8⁺ qui jouent un rôle prédominant lors de la pathogenèse comme le démontrent les études chez des souris déficientes pour la molécule CD8 (Fung-Leung W. P. et al. 1991) ou déficientes pour la β 2-microglobuline (Quinn D. G. et al. 1993). Dans le modèle viral MHV, le transfert de cellules T CD4⁺ ou de cellules T CD8⁺ isolées à partir de la rate d'une souris C57BL/6 infectée par le virus MHV est suffisant pour induire la démyélinisation chez une souris receveuse C57BL/6 RAG^{-/-} infectée par le virus MHV, les cellules T CD4⁺ étant cependant moins efficaces que les cellules T CD8⁺ (Wu G. F. et al. 2000). Avec ce même modèle de démyélinisation induite par le virus MHV, il a été démontré que des cellules T CD8⁺ activées qui ne sont pas spécifiques pour le virus MHV ou pour des antigènes présents dans le SNC peuvent induire la démyélinisation chez les souris infectées avec MHV. En effet, la démyélinisation est induite chez des souris ayant uniquement des cellules T CD8⁺ spécifiques pour le peptide gp33 de LCMV (souris RAG2^{-/-} TCR Tg P14) lorsque ces souris sont immunisées avec le peptide gp33 puis infectées avec MHV (Haring J. S. et al. 2002). Ces résultats suggèrent que des cellules T CD8⁺ qui ne sont pas spécifiques pour des antigènes du SNC peuvent causer des dommages à la gaine de myéline lorsqu'elles sont activées spécifiquement. Dans le modèle LCMV cependant, il est impossible d'induire la démyélinisation chez les souris infectées en absence de cellules T CD8⁺ spécifiques à un antigène viral (McGavern D. B. et al. 2004) ce qui suggère que l'initiation de la

pathogénèse nécessite une reconnaissance spécifique au SNC et que l'action de cellules T CD8⁺ non spécifiques au SNC peut amplifier la pathologie mais pas l'initier. Une autre étude conduite dans le modèle MHV a également démontré que même si le recrutement secondaire de cellules T CD8⁺ non spécifiques au SNC formait une proportion importante de l'infiltrat durant la démyélinisation, les cellules T CD8⁺ non spécifiques recrutées ne contribuaient pas significativement à la pathogénèse en absence de reconnaissance spécifique (Chen A. M. et al. 2005).

Différentes études ont suggéré que les cellules T CD8⁺ pourraient être impliquées dans la pathogénèse de la sclérose en plaques. Des lymphocytes T CD8⁺ spécifiques pour des neuroantigènes peuvent être dérivés de patients atteints de la sclérose en plaques (Biddison W. E. et al. 1998, Crawford M. P. et al. 2004, Dressel A. et al. 1997, Honma K. et al. 1997, Jurewicz A. et al. 1998, Tsuchida T. et al. 1994) et il a été démontré que la réponse spécifique de ces lymphocytes T CD8⁺ autoréactifs était fonctionnellement différente de celle observée chez des sujets normaux (Crawford M. P. et al. 2004). De plus, il a été démontré qu'il y avait prédominance d'expansions clonales de lymphocytes T CD8⁺ et non de cellules T CD4⁺ aux niveaux des plaques de démyélinisation actives (Babbe H. et al. 2000) et que ces clones de cellules T CD8⁺ persistent dans le sang et/ou le liquide céphalo-rachidien des patients atteints de sclérose en plaques (Jacobsen M. et al. 2002, Skulina C. et al. 2004). La spécificité antigénique des clones de cellules T CD8⁺ issus de l'expansion clonale chez les patients atteints de sclérose en plaques est cependant inconnue.

Une fois activées et différenciées, les cellules T CD8⁺ cytotoxiques détruisent leur cible par deux principaux processus; le système Fas-FasL et le système

perforine/granzyme (Kagi D. et al. 1994). Cependant, l'action des cellules T CD8⁺ cytotoxiques étant restreinte aux cellules exprimant les molécules du CMH I, il est important d'identifier les populations cellulaires présentes au SNC qui expriment des molécules CMH I. Le SNC a été longtemps considéré à l'abri des dommages induits par les cellules cytotoxiques en raison de l'absence apparente d'expression de molécules CMH I (Joly E. et al. 1991). Cependant, la plupart des cellules présentes au SNC (cellules de la microglie, astrocytes, oligodendrocytes et neurones) augmentent l'expression des molécules du CMH I en conditions pro-inflammatoires et il est maintenant bien établi que l'expression du CMH I est induite chez les oligodendrocytes et les neurones des patients atteints de la sclérose en plaques (Hoftberger R. et al. 2004). Il a également été démontré que des cellules T CD8⁺ dérivées de patients atteints de sclérose en plaques peuvent lyser des cultures primaires d'oligodendrocytes *ex vivo* (Jurewicz A. et al. 1998) et que des cellules T CD8⁺ spécifiques pour le peptide dominant de la glycoprotéine de l'enveloppe du virus de la chorioméningite lymphocytaire (gp33) peuvent lyser *in vitro* des neurones murins incubés avec le peptide gp33 et préalablement traités avec de l'IFN γ et de la tétrotoxine pour qu'ils expriment les molécules du CMH I (Medana I. et al. 2001). Les axones neuronaux présents dans les lésions de démyélinisation de patients atteints de sclérose en plaques expriment les molécules du CMH I dont les niveaux d'expression corrélerent avec la sévérité des symptômes et l'activité des lésions (Giuliani F. et al. 2003, Hoftberger R. et al. 2004). Les axones sont par conséquent susceptibles à l'attaque cytotoxique directe des cellules T CD8⁺ effectrices.

Parmi les cellules T CD8⁺ présentes dans les pathologies autoimmunes affectant le SNC, il existe une sous-population de cellules T CD8⁺ ayant des capacités suppressives

qui a été décrite dans le modèle EAE (Jiang H. et al. 1992, Koh D. R. et al. 1992). Des souris dans lesquelles l'EAE a été induite par immunisation avec la protéine MBP ne sont plus résistantes à la réinduction de la pathologie suite à une deuxième immunisation et montrent une plus grande fréquence de rechutes en absence de cellules T CD8⁺ (Jiang H. et al. 1992, Koh D. R. et al. 1992). Cette sous-population de cellules T CD8⁺ est capable de restreindre les capacités pathogéniques des cellules T CD4⁺ spécifiques à la protéine MBP du répertoire qui sont les plus réactives *in vitro* (Jiang H. et al. 2003). Le fait que les cellules T CD4⁺ encéphalitogéniques déficientes pour Qa-1, une molécule du CMH classe I qui est l'homologue de la molécule HLA-E chez l'humain, ne sont plus susceptibles à l'activité suppressive des cellules T CD8⁺ a démontré que l'activité suppressive de ces dernières sur les cellules T CD4⁺ encéphalitogéniques est dépendante de l'expression de la molécule Qa-1 par les cellules T CD4⁺ autoréactives (Hu D. et al. 2004). Le mécanisme précis utilisé par cette sous-population de cellules T CD8⁺ suppressives restreintes à Qa-1 est encore indéterminé, mais il a été démontré que ces cellules sont capables de limiter la différenciation des cellules T CD4⁺ spécifiques à la myéline vers le phénotype T_H1 (Jiang H. et al. 2001). Dans un autre modèle EAE dans lequel la pathologie est induite par l'immunisation de souris avec le peptide MOG₃₅₋₅₅, on observe une aggravation des symptômes chez des souris CD8^{-/-} (Najafian N. et al. 2003) ou chez des souris traitées avec un anticorps monoclonal anti-CD8 avant immunisation (Montero E. et al. 2004, Najafian N. et al. 2003). Cette exacerbation des symptômes peut être prévenue par le transfert adoptif de cellules T CD8⁺ CD28⁻ qui suppriment la réponse des cellules T encéphalitogéniques en stimulant les capacités tolérogéniques de cellules présentatrices d'antigènes (Najafian N. et al. 2003). Les propriétés inhibitrices des

cellules T CD8⁺ isolées de patients atteints de sclérose en plaques sont réduites lorsque comparées à celles d'individus contrôles (Antel J. et al. 1986, Antel J. P. et al. 1986, Balashov K. E. et al. 1995). En effet, lorsque mises en présence de lymphocytes T stimulés par un anticorps anti-CD3 ou par la concanavaline-A, des lignées cellulaires établies à partir de cellules T CD8⁺ isolées de patients atteints de sclérose en plaques montrent des capacités suppressives inférieures à celles montrées par des lignées cellulaires établies à partir d'individus normaux (Antel J. et al. 1986, Antel J. P. et al. 1986). D'autre part, les fonctions inhibitrices des cellules T CD8⁺ suppressives produites lors d'une réaction autologue mixte de lymphocytes en milieu conditionné sont inférieures chez les patients atteints de la forme progressive de la sclérose en plaques comparativement à celles de patients atteints de la forme cyclique ou à celles d'individus contrôles (Balashov K. E. et al. 1995). Il apparaît donc que des cellules T CD8⁺ pathogéniques et suppressives constituent différentes sous-populations de cellules T CD8⁺ qui jouent des rôles distincts lors de pathologies autoimmunes affectant le SNC.

L'expansion oligoclonale de cellules T CD8⁺ observée au SNC des patients atteints de sclérose en plaques (Babbe H. et al. 2000) suggère que les cellules T CD8⁺ ont été activées ou à tout le moins réactivées dans l'organe cible. Même si les oligodendrocytes et les neurones ont le potentiel de présenter le complexe autoantigène/CMH I spécifique à la cellule T CD8⁺ autoréactive, ceux-ci ne disposent pas des molécules de costimulation nécessaires à l'activation des cellules T CD8⁺. Cette activation est donc réservée au CPAs résidentes au SNC ou à celles qui ont migré à partir de la périphérie et qui possèdent les capacités costimulatoires requises (voir section 1.0.7). Le processus de présentation antigénique des CPAs par les molécules CMH I est

généralement qualifié de voie endogène parce que la majorité des peptides présentés sont des peptides dérivés de protéines synthétisées à l'intérieur de la CPA. Des peptides viraux peuvent également être présentés par la voie endogène du CMH I si la CPA est infectée par un virus. Les antigènes exogènes acquis selon différents mécanismes d'endocytose par la CPA seraient présentés par les molécules du CMH II et leur présentation serait par conséquent restreinte aux cellules T CD4⁺. Ces deux voies d'acquisition et de présentation peptidique par les différentes molécules CMH représentent les routes classiques.

Le processus d'activation des cellules T CD8⁺ autoréactives spécifiques à un organe particulier n'est pas encore complètement établi. Bien que les cellules ciblées expriment le complexe CMH de classe I/autoantigène, elles n'expriment généralement pas les molécules de costimulation requises à l'activation optimales des cellules T. Il a donc été suggéré que les CPAs professionnelles résidentes d'un organe utiliseraient une voie parallèle d'acquisition d'antigènes exogènes pour permettre leur présentation par les molécules du CMH I (Bevan M. J. 1976, Bevan M. J. 1976, Kurts C. et al. 1996). Ce processus est appelé présentation croisée et l'étude des mécanismes impliqués est encore toute récente. Trois groupes ont rapporté l'existence d'un processus permettant la fusion de phagosomes avec des vésicules dérivées du réticulum endoplasmique (RE) contenant toutes les molécules nécessaires à l'assemblage du complexe peptide/CMH I, soit le transporteur associé à la maturation de l'antigène (TAP), la tapasine et la calreticuline (Cresswell P. et al. 2003, Guermonprez P., Matus A. et al. 2003). Les antigènes exogènes phagocytés seraient exportés au cytosol, dégradés par les protéasomes associés aux vésicules dérivées du RE, puis finalement réintroduits sous forme peptidique dans la

vésicule fusionnée via le complexe TAP pour être chargés sur le CMH I. Plusieurs types d'antigènes auraient accès à la présentation croisée: les protéines solubles (Pooley J. L. et al. 2001, Staerz U. D. et al. 1987), les parasites et bactéries intracellulaires (Belkaid Y. et al. 2002, Pfeifer J. D. et al. 1993) et les antigènes cellulaires provenant de cellules viralement infectées, de cellules tumorales ou de cellules apoptotiques (Bevan M. J. 1976, Crotty S. et al. 1999, Gooding L. R. et al. 1980, Huang A. Y. et al. 1996, Kurts C. et al. 1996, Morgan D. J. et al. 1999, Ramirez M. C. et al. 2002, Sigal L. J.). La présentation croisée serait donc un mécanisme potentiel permettant la présentation d'autoantigènes exogènes via le CMH I des CPAs pour la stimulation des cellules T CD8⁺ autoréactifs.

1.0.6 L'implication du système de costimulation B7/CD28 dans l'autoimmunité affectant le SNC

La régulation de l'activation des lymphocytes T autoréactifs étant un mécanisme important dans le contrôle de l'autoimmunité et le maintien de la tolérance périphérique, différentes études ont cherché à évaluer le rôle du système de costimulation B7/CD28 dans différents modèles de pathologies autoimmunes (Salomon B. et al. 2001). Il a été démontré que l'expression des molécules B7.1 et B7.2 est augmentée dans le SNC des patients atteints de sclérose en plaques ainsi que dans celui des souris EAE (Genc K. et al. 1997, Monteyne P. et al. 1998, Sellebjerg F. et al. 1998, Svenningsson A. et al. 1997, Windhagen A. et al. 1995). L'expression des molécules B7 dans le SNC du modèle EAE varie selon la phase clinique observée: expression élevée durant la phase active et les rechutes, faible ou nulle durant les rémissions (Issazadeh S. et al. 1998). La molécule

B7.2 a été détectée sur les cellules lymphoïdes infiltrantes, sur les cellules de la microglie et sur les astrocytes (Issazadeh S. et al. 1998). Dans le modèle EAE, le blocage de l'interaction B7/CD28 au moment de l'immunisation résulte systématiquement en une réduction de la sévérité de la pathologie, que ce soit par l'utilisation d'une combinaison d'anticorps anti-B7.1 et anti-B7.2 (Girvin A. M. et al. 2000), d'anticorps bloquant anti-CD28 (Perrin P. J. et al. 1999), de la protéine de fusion CTLA-4-Ig (Arima T. et al. 1996, Croxford J. L. et al. 1998, Khoury S. J. et al. 1995, Racke M. K. et al. 1995) ou encore par l'utilisation de souris qui n'expriment pas les molécules B7 (souris B7.1/B7.2-/-) (Chang T. T. et al. 1999, Chang T. T. et al. 2003) ou le récepteur CD28 (CD28-/-) (Chang T. T. et al. 1999, Girvin A. M. et al. 2000, Oliveira-dos-Santos A. J. et al. 1999). Une étude a démontré que la réduction des symptômes cliniques suite à l'immunisation de souris CD28-/- avec MBP corrèle avec la baisse de prolifération des cellules T spécifiques pour la MBP isolées des ganglions lymphatiques (Oliveira-dos-Santos A. J. et al. 1999), suggérant un rôle pour le système B7/CD28 dans l'expansion périphérique des cellules T autoréactives lors de l'immunisation. Une autre étude propose que la prévention de l'EAE par le blocage du système de costimulation B7/CD28 durant l'immunisation est due à une différenciation marquée des cellules T autoréactives vers le phénotype effecteur T_H2 plutôt que T_H1 (Khoury S. J. et al. 1996).

On attribue un rôle critique au système de costimulation B7/CD28 non seulement dans la phase initiatrice, mais également dans la phase effectrice de l'EAE au SNC (Chang T. T. et al. 1999, Chang T. T. et al. 2003, Cross A. H. et al. 1999, Perrin P. J. et al. 1999), démontrant que l'expression des molécules B7 directement dans le SNC est importante pour l'action cellules T effectrices encéphalitogéniques. L'importance des

signaux costimulateurs reçus au SNC par les cellules T encéphalitogéniques a également été démontré par le fait que le blocage du système B7/CD28 par la protéine de fusion CTLA-4-Ig est plus efficace pour diminuer les manifestations cliniques lorsque la protéine de fusion CTLA-4-Ig est délivrée directement dans le SNC (Croxford J. L. et al. 1998) comparativement à son injection systémique (Arima T. et al. 1996, Khoury S. J. et al. 1995). L'expression des molécules de costimulation B7 au SNC est notamment nécessaire pour supporter la survie cellulaire des cellules T pathogéniques au parenchyme et le maintien de l'inflammation durant la phase effectrice de l'EAE (Chang T. T. et al. 2003). La prolifération des cellules T effectrices T_{H1} étant très dépendante des signaux de costimulation délivrés par le système B7/CD28 (Schweitzer A. N. et al. 1998), il est probable que la prolifération des cellules T pathogéniques dans le SNC soit affectée en absence de costimulation. Donc, plusieurs éléments tendent à révéler un rôle prédominant pour le système de costimulation B7/CD28 dans le processus autoimmun pouvant affecter le système nerveux.

1.0.7 Les cellules présentatrices d'antigènes au SNC

Le statut immunitaire du SNC est particulier étant donné la barrière hémato-encéphalique qui sépare la circulation sanguine périphérique de la circulation tissulaire. Il est maintenant clair que les cellules T naïves peuvent traverser la barrière hémato-encéphalique du SNC que celui-ci soit inflammé ou non, avec cependant moins d'efficacité que les cellules T activées ou mémoires (Brabb T. et al. 2000, Krakowski M. L. et al. 2000, Owens T. et al. 1998). On ne sait pas si les cellules T autoréactives sont initialement activées avant ou après leur entrée au SNC, mais il a été clairement démontré

que les cellules T autoréactives doivent être restimulées au SNC par les CPAs locales pour exercer leurs fonctions effectrices (Flugel A. et al. 2001). Les cellules de la microglie, les macrophages périvasculaires et les cellules dendritiques sont les trois principaux types cellulaires pouvant exercer le rôle de CPA professionnelle au SNC. Les cellules de la microglie composent une population majeure du parenchyme neural. À l'état quiescent, ce sont des cellules hautement ramifiées avec des extensions d'une longueur de 15 à 25 μm (Raivich G. et al. 2004). Les macrophages périvasculaires, cellules dérivés de la moelle osseuse (Hickey W. F. et al. 1992), sont localisés entre l'endothélium des vaisseaux sanguins et la membrane basale qui séparent le vaisseau sanguin du parenchyme neural, soit l'espace périvasculaire. Les macrophages périvasculaires ne présentent pas une structure ramifiée, mais présentent plutôt une forme allongée avec des extensions courtes et larges (Raivich G. et al. 2004). La population de macrophages périvasculaires serait remplacée de façon continue par des macrophages dérivés des monocytes sanguins (Bechmann I. et al. 2001, Kim W. K. et al. 2006). Différents marqueurs phénotypiques qui caractériseraient les macrophages périvasculaires ont été rapportés: la combinaison CD163 et CD14 (Kim W. K. et al. 2006) et la combinaison CD163 avec le récepteur du mannose (MR) et un récepteur pour les motifs moléculaires associés à un pathogène (PAMPs), le DC-SIGN (Fabrick B. O. et al. 2005). De ces marqueurs, seul le récepteur du mannose (MR) permet de différencier chez l'humain les macrophages périvasculaires des macrophages infiltrants lors d'événements inflammatoires car 10-30% des monocytes sanguins humains sont CD163⁺ (Fabrick B. O. et al. 2005). Dans un SNC de rat normal ou inflammé (e.g. EAE),

l'expression de CD163 est spécifique aux macrophages périvasculaires (Fabriek B. O. et al. 2005).

Les cellules dendritiques composent une sous-population leucocytaire qui n'est pas spécifique au SNC et qui peut migrer du sang vers les tissus périphériques (Banchereau J. et al. 1998). Une fois aux tissus périphériques, les cellules dendritiques immatures sont très ramifiées et se spécialisent pour la capture d'antigènes (Banchereau J. et al. 1998). Dans un SNC sain et normal, les cellules dendritiques ne sont pas présentes au parenchyme mais plutôt aux méninges et aux plexus choroïdes (Hanly A. et al. 1998, Matyszak M. K. et al. 1996, McMenamin P. G. 1999, Serafini B. et al. 2000, Serot J. M. et al. 1997). La combinaison de marqueurs phénotypiques CD11c et DC-SIGN (Greter M. et al. 2005), la combinaison CD11c avec le récepteur multi-lectine DEC-205 (Serafini B. et al. 2000) et la combinaison DEC-205 et du marqueur de maturation dendritique MIDC-8 ont été utilisés pour identifier les cellules dendritiques dans le SNC inflammé. Cependant, parce que les macrophages infiltrants expriment CD11c (Serafini B. et al. 2000) et que les macrophages périvasculaires expriment DC-SIGN (Fabriek B. O. et al. 2005), la combinaison CD11c et DC-SIGN (Greter M. et al. 2005) ne permet pas d'identifier clairement les cellules dendritiques. C'est donc l'utilisation des marqueurs DEC-205 et MIDC-8 qui a permis d'établir que durant la phase aiguë de l'EAE les cellules dendritiques se retrouvent principalement avec les infiltrats cellulaires, que quelques cellules dendritiques sont dispersées dans le parenchyme et que les cellules dendritiques sont pratiquement absentes de l'espace périvasculaire (Serafini B. et al. 2000).

Pour activer de façon optimale des cellules T autoréactives, ces différentes populations cellulaires doivent posséder ou acquérir la capacité de présenter efficacement des antigènes en plus de fournir les signaux de costimulation requis. Les cellules de la microglie sont des cellules très sensibles qui s'activent rapidement lors de toute pathologie ou inflammation affectant le SNC (Gehrmann J. 1996, Kreutzberg G. W. 1996) et qui peuvent s'activer suite à une infection systémique (Perry V. H. et al. 2003). À l'état quiescent, les cellules de la microglie adultes présentent un profil de CPA immature (faibles niveaux d'expression des molécules CMH I et II, des molécules de costimulation B7.1 et B7.2 et du corécepteur CD40) et ne peuvent stimuler efficacement la prolifération de lignées de cellules T spécifiques à la protéine MBP (Carson M. J. et al. 1998, Ford A. L. et al. 1995). Cependant, il a été démontré que les cellules de la microglie à l'état quiescent interagissent très activement avec leur environnement par l'intermédiaire d'excroissances très mobiles qui sondent et acquièrent des composantes tissulaires de façon très dynamique (Nimmerjahn A. et al. 2005). Les cellules de la microglie deviennent des CPAs compétentes et augmentent leur expression des molécules CMH I, CMH II, B7.1, B7.2 et CD40 lorsque qu'elles sont stimulées sous différentes conditions (Carson M. J. 2002, Guillemin G. J. et al. 2004). Le récepteur de l'IFN γ est constitutivement exprimé sur les cellules de la microglie (Vass K. et al. 1990) et l'IFN γ est la cytokine inflammatoire la plus efficace pour activer les cellules de la microglie (Benveniste E. N. 1998, Colton C. A. et al. 1994, Deckert-Schluter M. et al. 1999, Nguyen V. T. et al. 2000). Il a aussi été rapporté que les cellules de la microglie isolées du SNC d'une souris infectée par le virus TMEV peuvent présenter des peptides dérivés de la myéline à des cellules CD4⁺ contrairement aux cellules de la microglie isolées du

SNC d'une souris contrôle non-infectée qui ne le peuvent pas (Katz-Levy Y. et al. 1999). Cette même étude a également montré que la présentation endogène de peptides dérivés de la myéline à des cellules CD4⁺ était dépendante du système de costimulation B7/CD28 (Katz-Levy Y. et al. 1999). Les récepteurs Toll-like (TLRs) stimulent également l'acquisition de molécules de costimulation et des fonctions de présentation antigénique par les cellules de la microglie (Olson J. K. et al. 2004). Les TLRs sont utilisés par les cellules du système immunitaire pour reconnaître les motifs moléculaires associés à un pathogène (PAMPs), des structures exprimées par plusieurs classes de pathogènes mais absents des cellules eucaryotes (Takeda K. et al. 2003). Plusieurs études corrélient l'activation des cellules de la microglie avec le déclenchement de l'autoimmunité au SNC dans différents modèles (Juedes A. E. et al. 2001, Mack C. L. et al. 2003, Olson J. K. et al. 2001). Il a également été démontré que le blocage de l'activation de la microglie était suffisant pour prévenir la démyélinisation dans l'EAE (Heppner F. L. et al. 2005).

Les macrophages infiltrants jouent un rôle important dans la pathogenèse du modèle animal EAE comme le démontrent les études chez les animaux dont les macrophages périphériques sanguins ont été éliminés et qui sont résistants au développement de signes cliniques (Huitinga I. et al. 1995, Huitinga I. et al. 1990, Tran E. H. et al. 1998). Le rôle spécifique des macrophages périvasculaires dans l'EAE est moins bien défini. Une étude dans laquelle l'élimination spécifique des macrophages périvasculaires ne diminue que légèrement les signes cliniques de l'EAE suggère que les macrophages périvasculaires contribuent à la pathogenèse de l'EAE mais ne sont pas requis pour l'initiation de la pathologie (Polfliet M. M. et al. 2001).

Les cellules dendritiques activées expriment de hauts niveaux des molécules du CMH II, des molécules de costimulation B7 et du corécepteur CD40 (Banchereau J. et al. 1998), molécules qui permettent à ces cellules présentatrices d'antigènes d'être excessivement compétentes pour activer des cellules T naïves et pour initier une réponse immune (Steinman R. M. 1991). Il a été démontré que le recrutement et la maturation des cellules dendritiques sont associés à l'initiation et la progression de l'EAE (Serafini B. et al. 2000, Suter T. et al. 2000) en plus d'être impliquées dans d'autres pathologies autoimmunes comme le diabète (Jansen A. et al. 1994, Ludewig B. et al. 1998) et l'arthrite rhumatoïde (Thomas R. et al. 1996). Dans l'EAE induite suite à l'immunisation de souris avec le peptide MOG₃₅₋₅₅, la détection des cellules dendritiques au SNC précède le déclenchement des premiers signes cliniques (Suter T. et al. 2000). Une autre étude a établi qu'il y avait accumulation de cellules dendritiques qui expriment les molécules du CMH II, le corécepteur CD40 et la molécule de costimulation B7.2 avec l'infiltrat inflammatoire (Serafini B. et al. 2000). De plus, il a été récemment démontré que les cellules dendritiques constitueraient la principale population cellulaire responsable de la présentation antigénique aux cellules T autoréactives au SNC dans le modèle EAE (Greter M. et al. 2005). Ces études démontrent que les cellules dendritiques sont recrutées et activées au parenchyme du SNC et jouent un rôle dans l'initiation et la progression de l'EAE.

Les astrocytes sont un autre type de cellules gliales qui est soupçonné d'agir comme CPA dans le SNC, mais les conclusions quant à un tel rôle sont controversées. En effet, il a été rapporté que des astrocytes isolés et stimulés par l'IFN γ sont capables de présenter *in vitro* des peptides dérivés de la myéline à des lignées de cellules T

spécifiques pour ces peptides (Tan L. et al. 1998). Cependant, une autre étude à démontré dans le modèle EAE que les astrocytes présents dans le SNC n'expriment pas B7.1 ou B7.2 à aucune étape de la pathogenèse, suggérant que les astrocytes ne pouvant fournir de signaux de costimulation adéquats seraient également incapables d'être des CPAs compétentes.

Il y a donc plusieurs types de cellules présentes au SNC qui peuvent contribuer à l'activation des lymphocytes T autoréactifs selon le modèle animal utilisé. Il est important de noter que les différentes études sur le rôles des différentes CPAs dans la promotion de l'autoimmunité au SNC portent sur l'activation des cellules T CD4⁺ et on ne sait pas si leurs conclusions et hypothèses s'appliquent également au cellules T CD8⁺.

1.0.8 Les lignées de souris transgéniques qui expriment de façon constitutive la molécule B7.2 sur les lymphocytes

Afin d'étudier le rôle des interactions B7.2/CD28 dans l'homéostasie des lymphocytes et les réponses immunes *in vivo*, trois lignées indépendantes de souris C57BL/6 B7.2 Tg ont été générées à partir du même transgène (les souris B7.2 Tg L7, B7.2 Tg L27 et B7.2 Tg L31) (Fournier S. et al. 1997). La construction transgénique utilisée pour sur-exprimer la molécule B7.2 dans les cellules lymphoïdes contient la séquence d'ADNc encodant la molécule B7.2, le promoteur du gène codant pour une molécule de CMH I (H-2K^b) et une séquence régulatrice du gène codant pour la chaîne μ des immunoglobulines (EI μ). Les lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ des trois lignées de souris B7.2 Tg expriment des niveaux élevés et similaires de la molécule B7.2 tandis que

les niveaux d'expression de la molécule B7.2 sur les cellules B varient selon la lignée: faibles dans les souris B7.2 Tg L31, modérés dans les souris B7.2 Tg L27 et élevés dans les souris B7.2 Tg L7 (Fournier S. et al. 1997).

L'expression constitutive de la molécule B7.2 sur les cellules B résulte en une diminution du nombre des cellules B en périphérie et en une fréquence réduite de cellules progénitrices de cellules B à la moelle osseuse dans les souris transgéniques exprimant des niveaux modérés (souris B7.2 Tg L27) et élevés (souris B7.2 Tg L7) de la molécule B7.2 sur les cellules B matures. La population des cellules B chez les souris B7.2 Tg L31 est intacte. L'élimination des cellules B dans les souris B7.2 Tg L27 et B7.2 Tg L7 est induite par les lymphocytes T et dépend de la signalisation du corécepteur CD28 (Fournier S. et al. 1997). Cette élimination requiert l'expression du transgène par les cellules B mais est indépendante de l'expression du transgène par les cellules T. Le même phénomène d'élimination des cellules B a été observée par un autre groupe qui a généré des souris transgéniques dans lesquelles les molécules B7.1 et B7.2 sont constitutivement exprimées sur les cellules B (Van Parijs L. et al. 1997). Le rôle physiologique du phénomène d'élimination des lymphocytes B observé dans ces souris transgéniques est encore inconnu. Il est possible que l'expression des molécules B7 par les cellules B immatures permette d'identifier les cellules qui reconnaissent des antigènes du soi et de les éliminer par un processus indépendant d'une reconnaissance antigénique de la part des cellules T.

L'expression constitutive des molécules B7.1 ou B7.2 par les lymphocytes T affecte leur homéostasie (Fournier S. et al. 1997, Van Parijs L. et al. 1997, Yu X. et al. 2000). Lorsque comparées aux souris contrôles, ces souris transgéniques présentent une

légère augmentation du nombre de lymphocytes T et une réduction du ratio de cellules T CD4/CD8 dans les organes lymphoïdes secondaires. De plus, la fréquence des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ qui expriment de hauts niveaux du marqueur phénotypique CD44 est également augmentée en périphérie dans les trois lignées de souris B7.2 Tg (Fournier S. et al. 1997). Ces observations indiquent que les interactions entre les molécules B7 exprimées par les lymphocytes T et le récepteur CD28 induisent un certain état d'activation des lymphocytes T qui reconnaissent des antigènes de l'environnement et/ou des antigènes du soi.

Les souris B7.2 Tg L31 ont également été utilisées dans un modèle de réaction du greffon contre l'hôte (Taylor P. A. et al. 2004) où les résultats suggèrent que l'expression de B7.2 sur les cellules T améliore la survie à la réaction du greffon contre l'hôte par une interaction cellule T-cellule T et l'interaction B7.2/CTLA-4. Dans ce modèle, des souris B10.BR receveuses irradiées ont reçu la moelle osseuse d'une souris C57BL/6 ainsi que des cellules T purifiées à partir d'une souris C57BL/6 contrôle ou d'une souris C57BL/6 B7.2 Tg L31. Aucune des souris ayant reçu les cellules T contrôles survivent plus de 20 jours à la réaction du greffon contre l'hôte comparativement à 38% des souris ayant reçu les cellules T B7.2 Tg qui survivent au moins 100 jours. Lorsque l'expérience est répétée en ajoutant un anticorps anti-B7.2 aux cellules transférées, le taux de survie des souris ayant reçu les cellules T contrôles est augmenté et le taux de survie des souris ayant reçu les cellules T B7.2 Tg est diminué. Les auteurs suggèrent que l'anticorps anti-B7.2 bloque l'interaction entre le corécepteur CD28 exprimé par la cellule T et la molécule B7.2 exprimée par la CPA dans les souris ayant reçu des cellules T contrôles tandis que l'anticorps anti-B7.2 bloque l'interaction entre CTLA-4 et la molécule B7.2 qui sont

exprimés sur les cellules T CPA dans les souris ayant reçu des cellules T B7.2 Tg. À partir des résultats obtenus, les auteurs avancent l'hypothèse que l'expression de la molécule B7.2 sur les cellules T pourrait jouer un rôle dans les mécanismes de régulation négative des réponses des cellules T.

1.0.9 Hypothèse et objectifs

Au cours de la reproduction des souris B7.2 Tg, il avait été observé que les souris d'une des trois lignées, soit la lignée B7.2 Tg L31, montraient des dysfonctions au niveau des membres inférieurs suggérant un possible déficit neurologique. Ces symptômes n'avaient jamais été observés chez les souris B7.2 Tg L27 et B7.2 Tg L7 qui constituent des lignées indépendantes, c'est-à-dire provenant de souris fondatrices différentes. Suite à ces observations, nous avons avancé l'hypothèse selon laquelle les souris B7.2 Tg L31 étaient affligées d'une pathologie autoimmune affectant le système nerveux et qu'une expression transgénique particulière de la molécule de costimulation B7.2 dans cette lignée en était la cause. Pour vérifier cette hypothèse nous avons établi initialement les objectifs suivants:

- i) établir si les symptômes neurologiques des souris B7.2 Tg L31 étaient associés à la présence d'infiltrats cellulaires et de lésions de démyélinisation dans le tissu nerveux,
- ii) dans un tel cas, caractériser l'infiltration cellulaire au système nerveux,
- iii) déterminer s'il s'agissait d'une pathologie dans laquelle les lymphocytes T sont impliqués et
- iv) déterminer la présence d'expression transgénique de la molécule de costimulation B7.2 au système nerveux et sa contribution potentielle dans la pathogenèse.

Cette première série de travaux, qui est présentée à la section 3.0, nous a permis d'établir que les souris B7.2 Tg L31 développent de façon spontanée une maladie démyélinisante du système nerveux qui est dépendante des lymphocytes T et dans laquelle l'expression transgénique de la molécule B7.2 par les cellules de la microglie joue un rôle crucial. Nous avons aussi établi qu'il y avait une infiltration importante du système par les lymphocytes T CD8⁺. Cette dernière observation nous a conduit à définir les rôles respectifs des cellules T CD8⁺ et CD4⁺ dans la pathologie observée et à effectuer l'analyse du répertoire des cellules T CD8⁺ infiltrées au système nerveux des souris B7.2 Tg L31. Nos études démontrent que les lymphocytes T CD8⁺ sont la sous-population de cellules T effectrices dans le développement de la pathologie et suggèrent que l'expression transgénique de la molécule B7.2 par les cellules de la microglie induit des expansions oligoclonales de ces cellules dans le système nerveux. Afin d'explorer les mécanismes par lesquels l'activation des cellules T CD8⁺ dans le système nerveux peut conduire au développement de lésions démyélinisantes nous avons étudié l'état d'activation de la microglie avant et après l'apparition des symptômes neurologiques et déterminé le rôle joué par la cytokine IFN γ , une cytokine produite par les lymphocytes T CD8⁺ activés, dans le développement de la pathologie.

Tout au long des travaux visant à caractériser la pathologie observée chez les souris B7.2 Tg L31, nous avons fréquemment utilisé les souris B7.2 Tg L27 en plus des souris de type sauvage C57BL/6 comme contrôles. Rappelons que comparativement aux souris de type sauvage C57BL/6, les souris B7.2 Tg L27 présentent un niveau d'expression de la molécule de costimulation B7.2 sur les cellules T comparable à celui retrouvé sur les cellules T des souris B7.2 Tg L31 ainsi qu'un ratio de cellules T

CD4/CD8 et une fréquence de cellules T CD44^{élevé} dans les organes lymphoïdes secondaires similaires à ceux qui sont retrouvés dans les souris B7.2 Tg L31.

2.0 Matériel et méthodes

2.0.1 Souris

Les souris B7.2 Tg lignée 31 (B7.2 Tg L31) et lignée 27 (B7.2 Tg L27) ainsi que le transgène utilisé pour leur production ont antérieurement été décrits (Fournier S. et al. 1997) et sont maintenues par croisements successifs sur un fond génétique C57BL/6. Les souris d'une même portée et négatives pour le transgène B7.2 sont utilisées comme souris contrôles dans toutes les expériences. Les souris TCR β $-/-$, I-A β $-/-$, CD4 $-/-$, TCR OT-1, IFN γ R $-/-$ proviennent toutes d'une source commerciale (Jackson Laboratory, Bar Harbor, ME) et ont été croisées selon le besoin avec les souris B7.2 Tg L31. Toutes les procédures expérimentales sont en accord avec les recommandations du Conseil Canadien de Protection des Animaux (CCPA) et approuvées par le comité de protection des animaux de l'université McGill.

2.0.2 Histologie

Suite à la perfusion intracardiaque de l'animal anesthésié avec 20 ml de PBS 1X (154 mM NaCl, 8.1 mM Na₂HPO₄•12H₂O, 2.68 mM KCl, 1.47 mM KH₂PO₄), différents organes ont été prélevés (moelle épinière, cerveau, coeur, foie, rein, poumon, pancréas et muscle). La moelle épinière est extraite par insufflation de PBS 1X dans le canal rachidien. Le cerveau est prélevé suite à une coupe sagittale de la boîte crânienne. Les tissus prélevés ont été immergés et congelés dans des réceptacle Tissue-Tek® (Sakura Finetek, Zoeterwoude, The Netherlands), avec du composé Tissue-Tek® O.C.T. ("Optimal Cutting Temperature") (Ted Pella inc., Redding, CA) puis des coupes de 7-10

µm d'épaisseur ont été préparées avec un cryostat. Ces coupes ont été déposées sur des lames de microscope, séchées à l'air, fixées 2 min dans de l'acétone à 4°C puis 2 min dans de l'acétone 50% à température pièce (TP), séchées à l'air et finalement réhydratées avec du PBS 1X. Les sections sont ensuite immergées dans la solution d'hématoxyline 1X (Sigma) pour 2 min, rincées à l'eau courante 5 min, trempées rapidement dans la solution d'alcool acide (76.6% EtOH, 1/300 v/v HCl 12N), rincées 2 X 2 min dans de l'eau distillée. Les coupes sont ensuite immergées pour 30 sec dans une solution éosine 1X (Sigma), déshydratées dans 3 bains successifs de 5 min d'EtOH 80%, d'EtOH 95% et d'EtOH 100% puis immergées pour 5 min dans un bain de xylène avant d'être montées sous une goutte de Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

2.0.3 Immunohistochimie

Les organes utilisés (moelle épinière et cerveau) ont été prélevés par dissection anatomique. Les organes ont été inclus dans l'O.C.T., coupés, mis sur lames de microscope, fixés et réhydratés selon les méthodes décrites à la Section 2.0.2. Pour empêcher la liaison non spécifique des anticorps aux récepteurs FcγII/III murins et pour bloquer les interactions non spécifiques potentielles, les coupes tissulaires ont été incubées 60 min avec un tampon de blocage 1X (20% sérum veau foetal dilué dans du surnageant d'hybridome 2.4G2 (source d'anti-CD16/CD32)). Tous les anticorps sont dilués 1/50 dans du tampon de blocage 0.5X. Les coupes sont incubées avec l'anticorps primaire biotiné (anti-CD8-bio (clone 53.6.7), anti-CD4-bio (clone GK1.5) ou anti-I-A^b-bio (clone KH74)). Les temps d'incubation à 4°C varient selon l'anticorps utilisé: 72 hrs pour l'anti-CD8-bio, 1 hr 30 min pour l'anti-CD4-bio et l'anti-I-A^b-bio. Suite à

l'incubation, les sections sont rincées 3 X 5 min dans du PBS 1X. Les enzymes peroxydases endogènes sont inhibées par l'incubation des coupes avec une solution d'H₂O₂ (10% MeOH, 3% H₂O₂ dans du PBS 1X) pour 10 min. Les coupes sont ensuite incubées 30 min avec l'anticorps secondaire (anticorps de lapin-anti-IgG de rat-bio, (clone, Jackson Laboratories) à une dilution 1/200. Les coupes sont ensuite rincées 3 X 5 min dans du PBS 1X. Les coupes sont ensuite incubées de 60 min à RT avec le complexe tertiaire ABC-HRP (provient du mélange d'une part de solution A (diluée 1/100 dans PBS 1X) et d'une part de solution B (diluée 1/100 dans PBS 1X) du Vector Peroxidase Staining kit™ (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Les coupes sont ensuite rincées 3 X 5 min dans du PBS 1X. Les sections sont ensuite incubées avec une solution de DAB (0.05% DAB (3,3'-diaminobenzidine tetrahydrochloride, (Sigma)), 0.015% H₂O₂ dans PBS 1X) de 5 à 10 min (selon l'intensité du signal) puis rincées à l'eau courante pour arrêter la réaction. Les sections sont ensuite montées sous une goutte de Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

2.0.4 Immunofluorescence

La moelle épinière a été prélevée par dissection anatomique. Les tissus prélevés ont été inclus dans l'O.C.T., coupés, mis sur lames de microscope, fixés et réhydratés selon les méthodes décrites à la Section 2.0.2. Les sections sont ensuite fixées 10 min dans une solution 4% PFA, perméabilisées 30 min dans une solution 1% Triton X-100/PBS 1X puis rincées 3 X 5 min dans PBS 1X. Les sections sont ensuite bloquées dans le réactif bloquant MOM (Vector Laboratories, Burlingame, CA) pour 30 min avant d'être incubées 60 min à TP avec l'anticorps primaire SMI-32 (Sternberger

Monoclonals, MA) dilué 1/500 ou l'anticorps primaire RIP (Chemicon International, Temecula, CA) dilué 1/1000. Les sections sont ensuite rincées 3 X 5 min avec PBS 1X puis incubées 60 min à TP avec l'anticorps secondaire chèvre-anti-souris-Cy3 (Jackson ImmunoResearch Laboratories, PEN) dilué 1/1000. Les sections sont ensuite rincées 3 X 5 min avec PBS 1X. Les sections marquées avec l'anticorps primaire RIP sont ensuite contre-marquée avec le colorant Hoechst (Molecular probes, Eugene, OR) dilué 1/1000 pour 10 min et ensuite rincées dans PBS 1X avant d'être montées sous une goutte de Vectashield. Le marquage à été visualisé avec un microscope à fluorescence Leica (Wetzlar, Germany).

2.0.5 Coloration de la myéline au Bleu de Toluidine

Suite à la perfusion intra-cardiaque de l'animal anesthésié avec 20 ml de PBS 1X, la moelle épinière est extraite par dissection anatomique. La moelle épinière est ensuite incubée O/N avec une solution de fixation (0.5% de paraformaldéhyde, 2.5% glutaraldéhyde dans PBS 1X). La moelle épinière est ensuite incluse dans de l'araldite et coupée en sections de 3 μm . Les sections sont ensuite séchées 1 min à 80°C, colorées 1 min avec le bleu de toluidine à 80°C, rincées à l'eau courante 2 min, séchées à l'air et finalement montées sous une goutte de Vectashield (Vector Laboratories, Burlingame, CA).

2.0.6 Isolation des cellules à partir des organes lymphoïdes secondaires

Les cellules des organes lymphoïdes secondaires proviennent de la rate et/ou de trois paires de ganglions lymphatiques, soit les ganglions inguinaux, axillaires et brachiaux. Les organes sont broyés entre deux lames de microscope aux extrémités givrées et la suspension cellulaire obtenue est centrifugée, resuspendue dans un tampon de lyse des globules rouges ACK (150 mM NH₄Cl, 1 mM KHCO₃, 0.1 mM Na₂EDTA), centrifugée encore, lavée et finalement resuspendue dans le milieu de culture RPMI-1640 (GibcoBRL) supplémenté avec 10% de sérum de veau fœtal (SVF) inactivé à la chaleur (GibcoBRL), 50µM β-mercaptoethanol (Bioshop), 100 U/ml pénicilline (Sigma) et 100 µg/ml streptomycine (GibcoBRL) défini comme RPMI-complet. Les cellules sont comptées avec un hémacytomètre et la viabilité cellulaire est établie avec l'utilisation d'une solution de bleu Trypan (0.4% in PBS 1X) (Sigma) lors du décompte.

2.0.7 Isolation des cellules mononuclées à partir du SNC

Suite à la perfusion intra-cardiaque de l'animal anesthésié avec 20 ml de PBS 1X, la moelle épinière est extraite par insufflation de PBS 1X dans le canal rachidien. Le cerveau est prélevé suite à une coupe sagittale de la boîte crânienne. Le cerveau et la moelle épinière sont ensuite écrasés ensemble au travers d'un tamis métallique (mesh 100 microns), l'homogénat est centrifugé, resuspendu dans 6 ml d'une solution Percoll™ 37% (Amersham) puis centrifugé à 3300 rpm pour 20 min. Le culot contenant lymphocytes, macrophages et cellules de la microglie est finalement lavé avec 5 ml de RPMI-1640 complet.

2.0.8 Marquages phénotypiques avec anticorps et analyse en cytométrie de flux

Les cellules à marquer (1×10^6 cellules) sont lavées avec le tampon FACS (1% sérum bovin adulte (SBA) inactivé à la chaleur dans PBS 1X contenant 0.1% NaN_3), centrifugées puis incubées avec 50 μl de surnageant d'hybridome 2.4G2 (contient anti-CD16/CD32) pendant 15 min pour empêcher la liaison non spécifique des anticorps aux récepteurs Fc γ II/III murins avant de marquer les cellules avec des anticorps spécifiques biotinylés ou fluorescents. Chaque marquage requiert une incubation de 25 min sur glace. Si un anticorps secondaire est requis, les cellules sont lavées avec le tampon FACS après l'incubation avec l'anticorps primaire puis incubées avec l'anticorps secondaire pour 25 min. Suite aux marquages, les cellules sont lavées 2X avec du PBS 1X avant l'acquisition des cellules à l'aide d'un appareil FACScan™ (BD Biosciences, San Jose, CA). Les données sont recueillies avec une fenêtre de sélection pour les cellules vivantes et une fenêtre de sélection additionnelle pour les cellules CD4⁺, CD8⁺ ou encore CD11b⁺ selon le besoin. Les données sont analysées avec le programme informatique Cell Quest software (BD Biosciences, Mountain View, CA). Les anticorps utilisés sont les suivants: CD4-FITC ou -PE ou -biot (clone GK1.5, BD PharMingen), CD8-FITC ou PE (clone 53-6.7, BD PharMingen). B7.2-PE (clone RMMP-2, Cedarlane), TCR β -biot (clone H57-597 PharMingen), CD11b-FITC ou -biot (clone M1/70.15, Cedarlane), CD45-FITC ou -PE-Cy5 (clone 30-F11, BD PharMingen), CD44-biot (clone IM7, BD PharMingen), CD62L-biot (clone MEL-14, BD PharMingen), CD69-biot (clone H1.2F3, BD PharMingen), I-A^b-biot (clone KH74, BD PharMingen), IFN γ -FITC (clone XMG-1.2, BD PharMingen), H-2K^b-biot (clone AF6-88.5, BD PharMingen), CD40-biot (clone 3/23, BD PharMingen), B7.1-PE (clone 16-10A1, Cedarlane), V α 2-FITC (clone B20.1, BD PharMingen),

Streptavidine-PE-Cy5 (BD PharMingen), ou SA-PE (BD PharMingen), ou SA-FITC (BD PharMingen), ont été utilisés comme anticorps secondaire.

2.0.9 Marquage intracellulaire de l'IFN γ

Des plaques de 24 puits sont recouvertes avec 500 μ l d'un anticorps monoclonal anti-CD3 (clone 2C11) 1 μ g/ml O/N à 4°C puis chacun des puits est lavé avec 2 ml de PBS 1X. Les cellules (2×10^6 cellules/puit) isolées des ganglions lymphatiques ou du SNC sont incubées dans 1 ml RPMI-complet avec bréfeldine A (20 μ g/ml) pour 3 heures. Les cellules recueillies sont marquées (voir section 2.0.8) avec les anticorps monoclonaux anti-CD8 et anti-CD44, puis fixées et perméabilisées avec la solution Cytotfix/Cytoperm™ selon les directives du fabricant et finalement marquées avec l'anticorps monoclonal anti-IFN γ .

2.1.0 Isolation de l'ARNm, synthèse de l'ADNc et PCR

L'ARNm des moelles épinières et ganglions lymphatiques a été isolé avec le réactif TRIzol® (GibcoBRL) en suivant les directives du manufacturier et dosé par densité optique. Nous avons utilisé 10 μ g d'ARNm pour la synthèse de l'ADNc avec la SuperScript™ II RNase H-Reverse transcriptase (Invitrogen life technologies) selon les directives du manufacturier. Les conditions utilisées lors des réactions PCR sont les suivantes: 95°C pour 5 min suivi de 30-35 cycles de 45sec. à 94°C, 45 sec. à 57°C, 1min à 72°C et une extension finale de 10 min à 72°C. Les séquences des paires d'oligonucléotides utilisés sont les suivantes:

GAPDH sens: 5'-CACTCACGGCAAATTCAACGGC-3'
 GAPDH antisens: 5'-TAGTGTTTGTACCCCCGTAGCC-3'
 TNF α sens: 5'-GTTCTATGGCCCAGACCCTCA-3'
 TNF α antisens: 5'-TCCCAGGTATATGGGCTCATAACC-3'
 Perforine sens: 5'-TCAATAACGACTGGCGTGTGGG-3'
 Perforine antisens: 5'-GTGGAGCTGTAAAGTTGCGGG-3'
 Granzyme B sens: 5'-GCCCAACAACATCAAAGAACAGG-3'
 Granzyme B antisens: 5'-GAGAACACATCAGCAACT TGGG-3'

Les produits de PCR sont séparés sur un gel d'agarose 1% et visualisés par coloration au bromure d'éthidium.

2.1.1 Analyse de la distribution des tailles du CDR3 de la chaîne β du TCR

L'ARNm des moelles épinières et ganglions lymphatiques de souris B7.2 Tg L31 ont été isolés et synthétisés en ADNc (voir section 2.1.0.). Ensuite, 21 réactions PCR ont été conduites pour chaque tissu analysé en utilisant une combinaison d'un oligonucléotide codant pour une séquence de la région constante de la chaîne β du TCR (C β) et un oligonucléotide codant pour une séquence d'une des 21 régions variables de la chaîne β du TCR (V β). Les séquences nucléotidiques utilisées sont les suivantes :

C β	5'-ATGGCTCAAACAAGGAGACCTTGG-3'
V β 2	5'-TCACTGATACGGAGCTGAGGC-3'
V β 3.1	5'-CCTTGCAGCCTAGAAATTCAGT-3'
V β 4	5'-GCCTCCAAGTCGCTTCCAACCTC-3'
V β 5.1	5'-CATTATGATAAAAATGGAGAGAGAT-3'
V β 5.2	5'-AAGGTGGAGAGAGACAAAGGATTC-3'
V β 5.3	5'-AGAAAGGAAACCTGCCTGGTT-3'
V β 6	5'-CTCTCACTGTGACATCTGCCC-3'
V β 7	5'-TACAGGGTCTCACGGAAGAAGC-3'
V β 8.1	5'-CATTACTCATATGTCGCTGAC-3'
V β 8.2	5'-CATTATTCATATGGTGCTGGC-3'
V β 8.3	5'-TGCTGGCAACCTTCGAATAGGA-3'
V β 9	5'-TCTCTCTACATTGGCTCTGCAGGC-3'
V β 10	5'-ATCAAGTCTGTAGAGCCGGAGGA-3'
V β 11	5'-GCACTCAACTCTGAAGATCCAGAGC-3'

Vβ12	5'-GATGGTGGGGCTTTCAAGGATC-3'
Vβ13	5'-AGGCCTAAAGGAACTAACTCCCAC-3'
Vβ14	5'-ACGACCAATTCATCCTAAGCAC-3'
Vβ15	5'-CCCATCAGTCATCCCAACTTATCC-3'
Vβ16	5'-CACTCTGAAAATCCAACCCAC-3'
Vβ18	5'-CAGCCGGCCAAACCTAACATTCTC-3'
Vβ20	5'-TCTGCAGCCTGGGAATCAGAA-3'

Les conditions utilisées lors des réactions PCR primaires sont les suivantes pour un volume final de 25 µl: 95°C pour 5 min suivi de 50 cycles de 45 sec à 94°C, 80 sec à 60°C, 1 min à 72°C et une extension finale de 10 min à 72°C. L'oligonucléotide Cβ a été marqué en 5' par la T4 polynucléotide kinase (Invitrogen™, Burlington, Ontario) avec γ-P³² ATP (Perkin Elmer, Woodbridge, Ontario) selon les directives du fabricant. L'excès de γ-P³² ATP fut retiré avec une micro-colonne Sephadex™ G-50 (Amersham Biosciences, Baie d'Urfé, Québec). 5 µl de chaque réactions PCR primaires ont été marqués radioactivement en utilisant l'oligonucléotide Cβ-γ-P³² et soumises à 3 cycles d'élongation secondaires (Run-Off reaction) avec les conditions suivantes pour un volume final de 25 µl: 95°C pour 5 min suivi de 3 cycles de 45 sec à 94°C, 80 sec à 60°C, 1 min à 72°C et une extension finale de 10 min à 72°C. On ajoute ensuite aux produits marqués un volume égal de tampon formamide (90% formamide, 10mM NaOH, 1mM EDTA) avant de les chauffer à 98°C pour 2 min. 9 µl de chaque échantillon est déposé sur un gel de séquençage 6% acrylamide préchauffé. La migration du gel s'effectue à 60W pour 2 hres. Le gel est ensuite séché, exposé 12 hres sur un écran Phosphor puis les données sont acquises à l'aide d'un appareil Storm™ (Molecular Dynamics, Sunnyvale, CA). Les données sont finalement analysées avec le programme NIH image.

2.1.2 Clonage et séquençage des régions CDR3 de la chaîne β du TCR

Les produits de réactions de PCR amplifiés avec l'oligonucléotide C β et l'oligonucléotide V β d'intérêt ont été directement insérés dans un vecteur TOPO® puis transformés dans *E.coli* en utilisant le TOPO TA Cloning® kit (Invitrogen™, Burlington, Ontario). Les cellules transformées ont été étalées sur des pétris LB AMP (Tryptone 10g/L, Extrait de levure 5g/L, NaCl 10g/L, Agar 10g/L, Ampécilline 100mg/ml) pour 24 hres. 60 colonies ont été piquées et cultivées individuellement dans 5 ml de milieu LB (Tryptone 10g/L, extrait de levure 5g/L, NaCl 10g/L, Ampécilline 100mg/ml) pour 12 hres. 2 μ l de chaque culture fut utilisé pour tester les colonies positive pour un insert CDR3 par PCR avec les oligonucléotides C β et V β d'intérêt ainsi que les conditions suivantes: 95°C pour 5 min suivi de 35 cycles de 45 sec à 94°C, 80 sec à 60°C, 1 min à 72°C et une extension finale de 10 min à 72°C. L'ADN plasmidique fut isolé des cultures positives pour un insert avec des colonnes QIAprep® Spin Miniprep (Qiagen, Mississauga, Ontario) et resuspendu dans 50 μ l d'H₂O. Les séquençages des inserts ont été effectués commercialement par le service de séquençage du Centre d'Innovation Génome Québec et Université McGill.

3.0 Résultats (section 1)

Cette première série de travaux a été publiée sous la forme d'un article parut dans le *FASEB Journal* (Zehntner S. P. et al. 2003) et dont je suis co-premier auteur. Ma contribution directe aux résultats présentés est intégrale pour toutes les figures à l'exception des études histologiques et immunohistochimiques où ma contribution directe se limite aux croisements des souris utilisées, les perfusions intra-cardiaques, les prélèvements des organes et leur inclusion dans une solution préservative. J'ai également participé à l'analyse des marquages histologiques et immunohistochimiques obtenus. Voici un rappel des objectifs visés dans cette section;

- i) établir si les symptômes neurologiques des souris B7.2 Tg L31 étaient associés à la présence d'infiltrats cellulaires et de lésions de démyélinisation dans le tissu nerveux,
- ii) dans un tel cas, caractériser l'infiltration cellulaire trouvée au système nerveux,
- iii) déterminer s'il s'agissait d'une pathologie dans laquelle les lymphocytes T sont impliqués et
- iv) déterminer la présence d'expression transgénique de la molécule de costimulation B7.2 dans le système nerveux et sa contribution potentielle dans la pathogenèse.

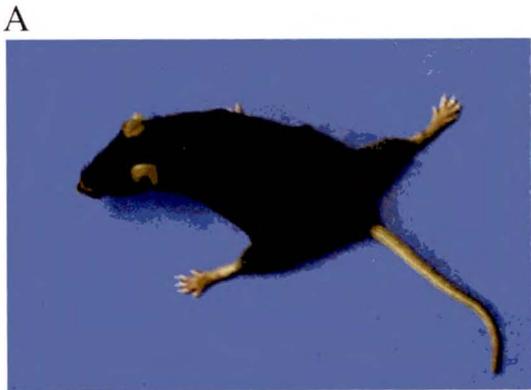
3.0.1 Les souris B7.2 Tg L31 développent des symptômes neurologiques

Nous avons observé qu'à partir de l'âge de 3 mois, toutes les souris B7.2 Tg L31 (n=38) montraient des dysfonctions majeures au niveau des membres inférieurs. Les principales manifestations cliniques sont les suivantes: rétraction des membres inférieurs lorsque la souris est soulevée par la queue, flaccidité de la queue ainsi qu'un manque de coordination et de proprioception (Fig. 1). L'ensemble de ces symptômes

Fig. 1 Symptômes neurologiques observés chez les souris B7.2 Tg L31.

Photographies démontrant des symptômes neurologiques affectant les souris B7.2 Tg L31. Faiblesse et paralysie partielle des membres inférieurs (A, B) ainsi que rétraction lorsque les souris sont maintenues par la queue (C).

Figure 1



suggère un déficit neurologique. Les souris affectées par cette pathologie présentent une perte de poids graduelle accompagnée d'une accentuation progressive des différents symptômes menant ultimement à la mort. L'âge médian auquel les souris B7.2 Tg L31 développent les premiers symptômes cliniques est de 136 ± 26 jours. L'incidence et la pénétrance de la pathologie ne sont pas affectées par l'hébergement des souris dans trois complexes animaliers différents ou par la re-dérivation de la lignée 31 par transfert d'embryons. Les souris B7.2 Tg L31 qui présentent des symptômes sont décrites comme symptomatiques et celles qui n'ont pas atteint le stade des manifestations cliniques sont décrites comme précliniques. Fait important, ces symptômes neurologiques n'ont jamais été observés chez les souris B7.2 Tg L27 (n=29), une autre lignée indépendante de souris B7.2 Tg.

3.0.2 Infiltrats cellulaires et lésions de démyélinisation dans le tissu nerveux des souris B7.2 Tg L31

Les souris B7.2 Tg L31 symptomatiques ont été examinées pour vérifier la présence d'infiltrats de cellules immunes au niveau du système nerveux. Des analyses histologiques révèlent la présence de cellules infiltrantes de morphologie lymphoïde dans le parenchyme de la moelle épinière (Fig. 2A). Ces infiltrats cellulaires ont été détectés dans la matière blanche et grise tout au long de la moelle épinière et ont été dénombrés selon les régions (sacrée, lombaire, thoracique, ou cervicale). Le plus grand nombre d'infiltrats fut constamment trouvé dans la matière blanche de la partie ventrale des régions sacrées et lombaires de la moelle épinière (Fig. 3A). Des infiltrats ont été

Fig.2 Infiltration de cellules mononuclées dans le SN de souris B7.2 Tg.

Marquage hématoxyline/éosine de sections tissulaires provenant de la moelle épinière (A, D, G et J), de ganglions spinaux (B, E, H et K) et du cerveau (C, F, I et L) d'une souris B7.2 Tg L31 symptomatique (Sympt. L31) (A-C), d'une souris B7.2 Tg L27 (L27) (D-F), d'une souris C57BL/6 (Ct) (G-I) et d'une souris TCR β -/- B7.2 Tg L31 (TCR β -/- L31) (J-L). Les flèches indiquent la présence d'infiltrats cellulaires.

Figure 2

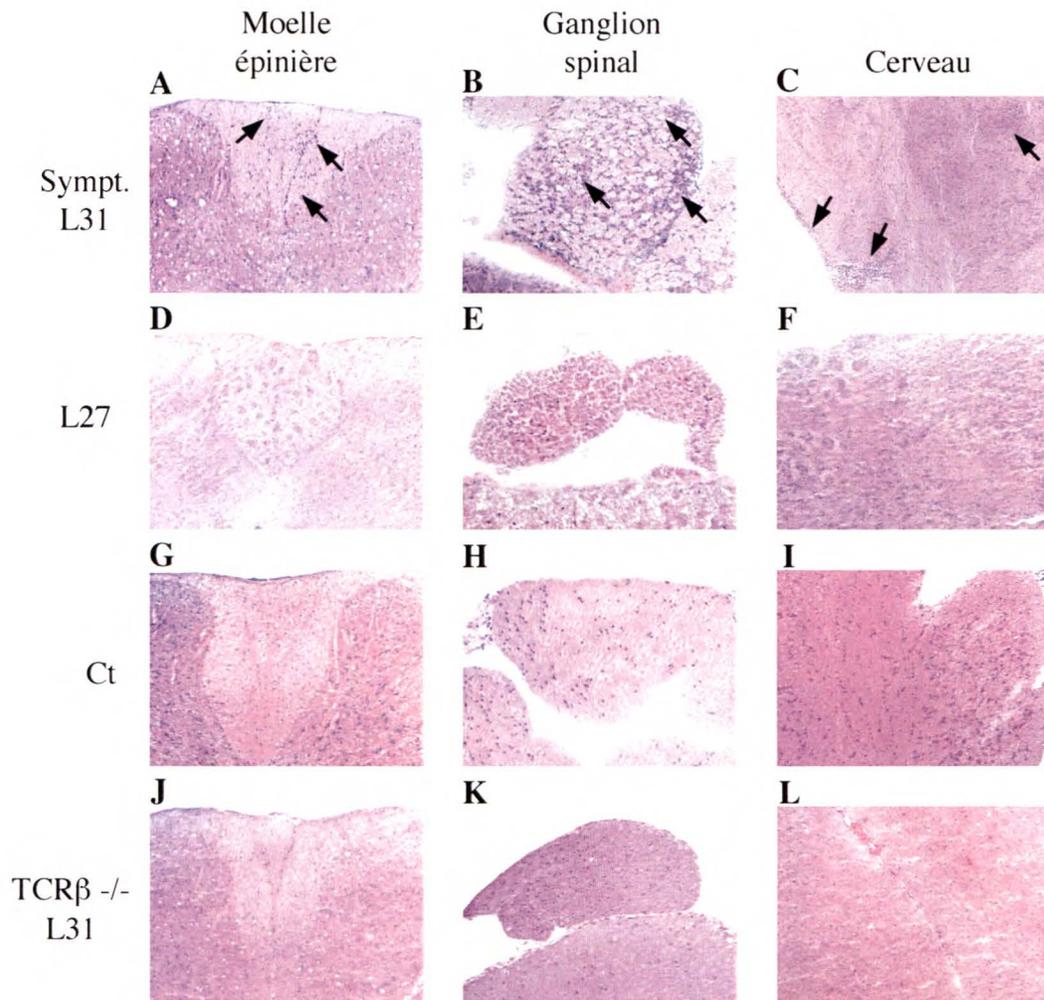
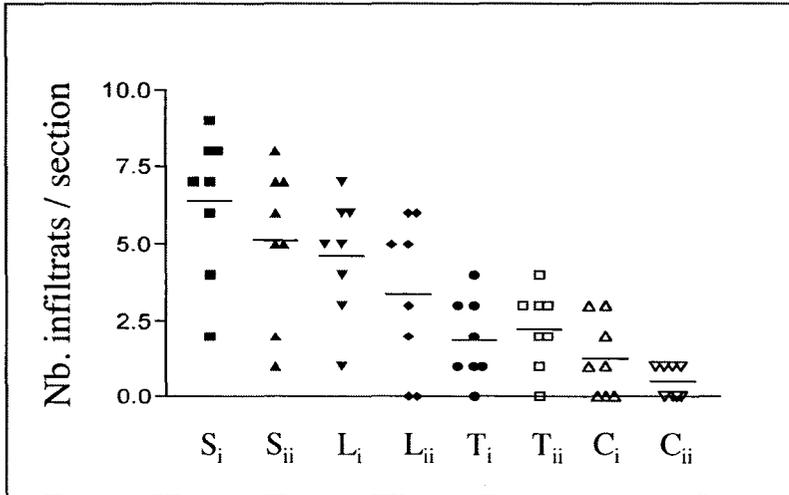


Fig. 3 Localisation des infiltrats inflammatoires dans le SN des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques.

Les parties inférieures (i) et supérieures (ii) de la région sacrale (S), lombaire (L), thoracique (T) et cervicale (C) de la moelle épinière ont été dissectées de souris B7.2 Tg L31 symptomatiques (n=8). Cinq sections par région de moelle épinière et de ganglion spinal ont été examinées par souris. Le nombre d'infiltrats inflammatoires présents dans chaque région de la moelle épinière (A) et du ganglion spinal (B) est présenté.

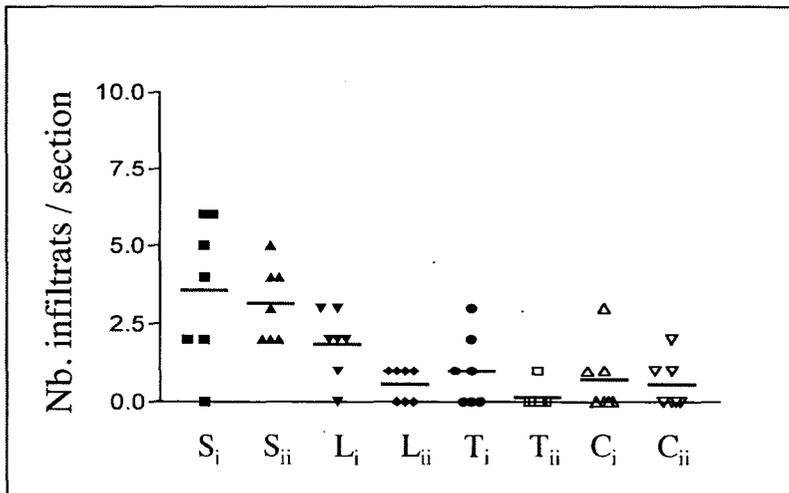
Figure 3

A



Moelle
épineière

B



Ganglions
spinaux

également observés au niveau des ganglions spinaux ventraux et dorsaux des régions inférieures de la moelle épinière (Fig. 2B et 3B). Aucun infiltrat n'a été détecté au niveau des nerfs sciatiques (résultat non montré). Des infiltrats périvasculaires et méningés ont été observés dans les régions sous-ventriculaires et dans le bulbe rachidien de la moitié des souris symptomatiques analysées (Fig. 2C). En accord avec l'absence de symptômes neurologiques, aucun infiltrat n'a été détecté dans le système nerveux des souris B7.2 Tg L27 et des souris C57BL/6 (Fig. 2D-F). Des études immunohistochimiques démontrent que les infiltrats cellulaires trouvés au parenchyme de la moelle épinière et dans les ganglions spinaux des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques contiennent des cellules CD4⁺ et CD8⁺ (Fig. 4). Nous n'avons pas détecté la présence de lymphocyte B dans les infiltrats (résultat non montré).

Nous avons vérifié l'état de myélinisation du système nerveux (SN) des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques et l'avons comparé à celui retrouvé chez une souris C57BL/6 (Fig 5). Des axones hautement myélinisés sont observés partout dans le tissu nerveux des souris C57BL/6 ainsi qu'une architecture tissulaire intacte (Fig. 5A et 5B). Les souris B7.2 Tg L31 symptomatiques montrent une perte de myéline autour de la fissure ventrale du parenchyme de la moelle épinière et dans les ganglions spinaux (Fig. 5C et 5D). On distingue également une désorganisation de l'architecture tissulaire en conjonction avec une présence de leucocytes aux sites démyélinisés chez les souris B7.2 Tg L31. Aucun infiltrat lymphocytaire n'a été détecté au coeur (Fig. 6A), au rein (Fig. 6B), au foie (Fig. 6C) ou au pancréas (Fig. 6D) des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques. Ces résultats suggèrent que les symptômes neurologiques observés chez les souris B7.2 Tg L31 sont le résultat d'une infiltration leucocytaire spécifique au

Fig.4 Caractérisation immunohistochimique de l'infiltrat cellulaire dans le SN des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques.

Sections tissulaires de moelle épinière (A, C) et de ganglions spinaux (B, D) marquées pour l'expression de la molécule CD4 (A, B) et CD8 (C, D).

Figure 4

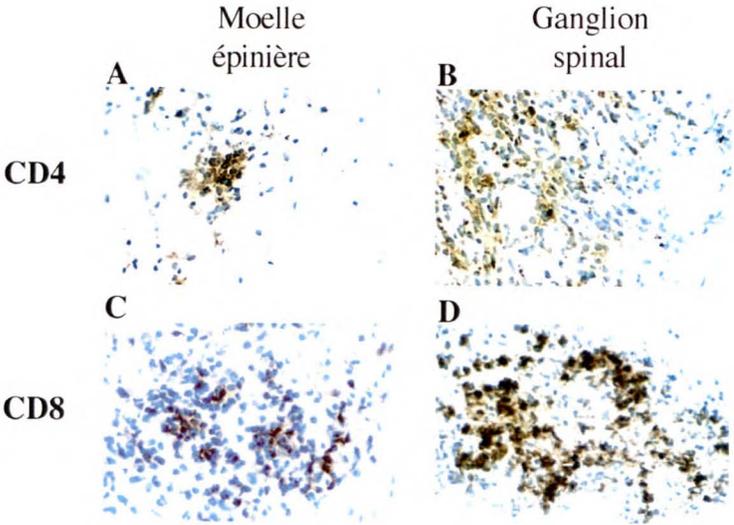


Fig.5 Démyélinisation spontanée au SN des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques.

Marquage au Bleu de Toluidine de sections tissulaires provenant de la moelle épinière (A, C) et de ganglions spinaux (B, D) d'une souris C57BL/6 (A, B) et d'une souris B7.2 Tg L31 symptomatique (C, D) qui révèle une démyélinisation sévère au système nerveux des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques.

Figure 5

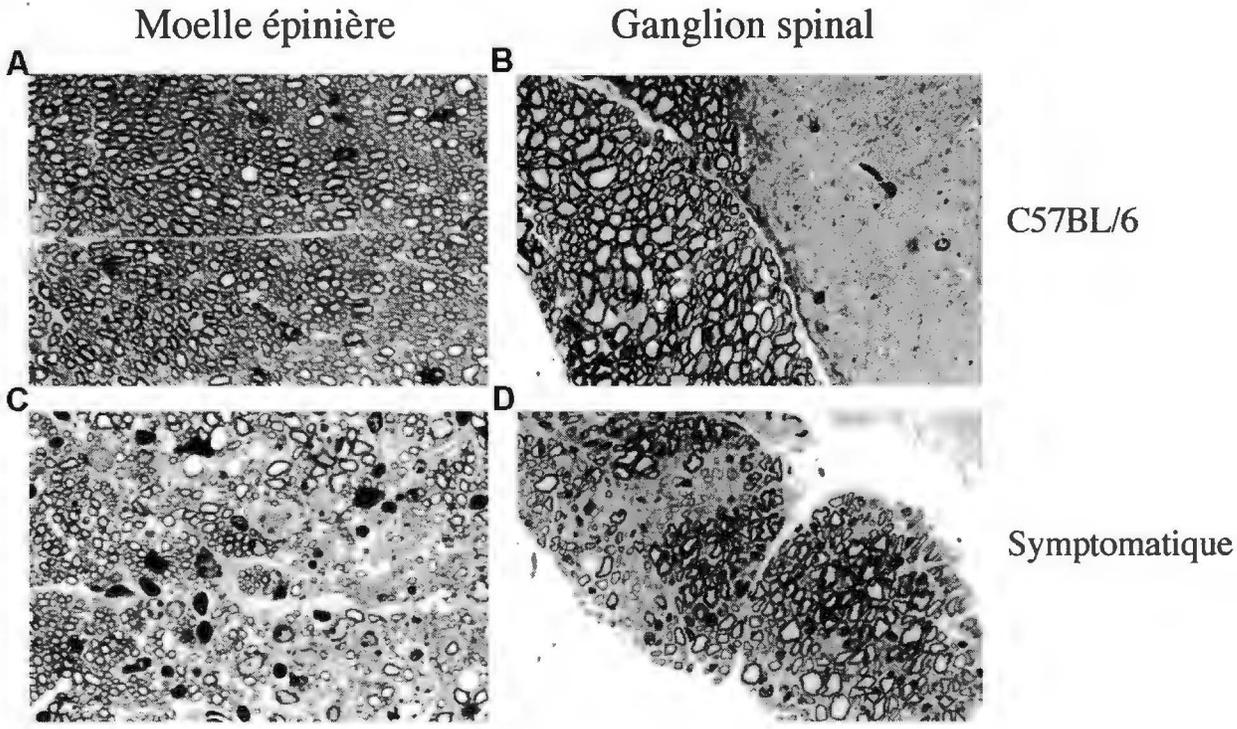
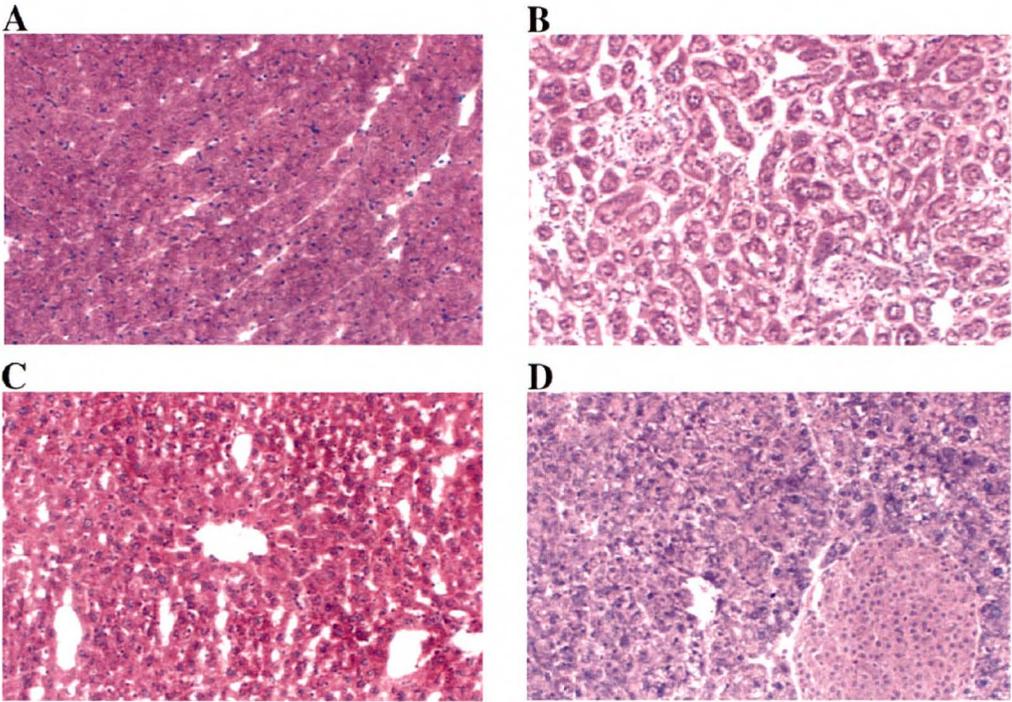


Fig.6 Spécificité tissulaire de l'infiltration cellulaire dans les souris B7.2 Tg L31 symptomatiques.

Marquage hématoxyline/éosine de sections tissulaires provenant du coeur (A), du rein (B), du foie (C) et du pancréas (D) d'une souris B7.2 Tg L31 symptomatique.

Figure 6



SN qui mène à des dommages subséquents à la myéline du système nerveux central et du système nerveux périphérique proximal.

3.0.3 Caractérisation de l'infiltration cellulaire au système nerveux

De façon à caractériser l'infiltrat lymphocytaire trouvé au système nerveux des souris B7.2 Tg L31, nous avons utilisé une procédure permettant d'isoler les cellules T infiltrant le tissu cible et ce, sans contamination par les cellules T de la circulation sanguine (voir section 2.0.7). On retrouve une faible fréquence de cellules T dans le SNC des souris C57BL/6 (Fig. 7A et 7B), comme déjà rapporté (Brabb T. et al. 2000). Les souris B7.2 Tg L31 symptomatiques présentent une augmentation dramatique de la fréquence de cellules T dans le SNC (Fig. 7A et 7B). Une augmentation de la fréquence de cellules T dans le SNC est également observée chez les souris B7.2 Tg L31 précliniques (Fig. 7A et 7B), mais cette augmentation est inférieure à celle observée chez les souris symptomatiques. Les souris B7.2 Tg L27, qui ne développent jamais la pathologie, ne montrent qu'une très faible augmentation de la fréquence de lymphocytes T dans le SNC comparé aux souris C57BL/6 (Fig. 7A et 7B). L'analyse des sous-populations de cellules T trouvées dans le SNC des souris B7.2 Tg L31 révèle une prévalence des cellules T CD8⁺. Le ratio de cellules T CD8⁺/CD4⁺ dans le SNC des souris B7.2 Tg L31 précliniques est plus élevé comparé à celui détecté chez les souris C57BL/6 et cette augmentation devient encore plus marquée avec l'apparition de manifestations cliniques (Fig. 7C).

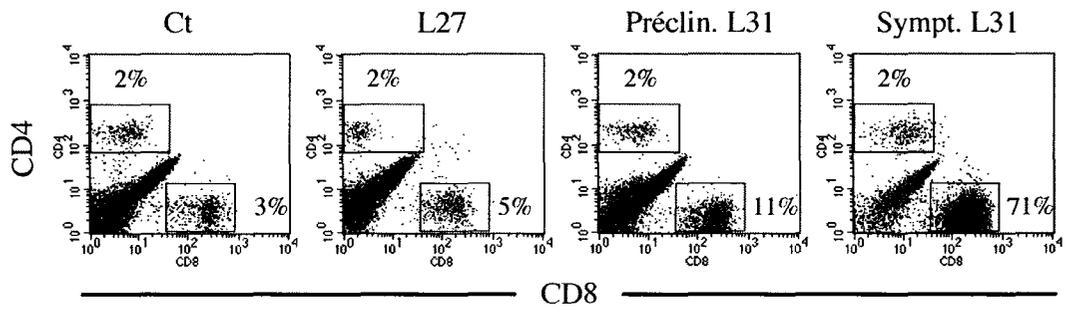
Pour définir le phénotype des cellules T infiltrant le SNC, les populations isolées ont été marquées avec des anticorps spécifiques pour des marqueurs d'activation et/ou

Fig. 7 Fréquence de cellules T infiltrant le SNC des souris B7.2 Tg L31.

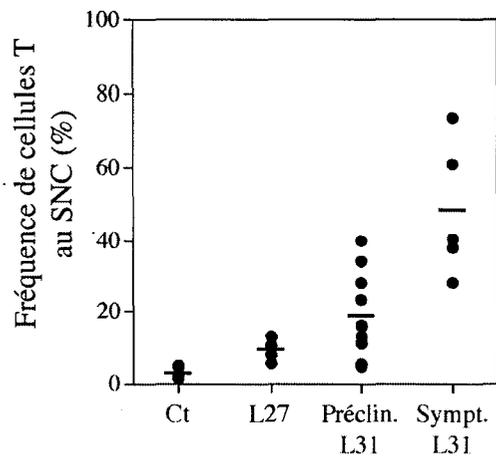
Analyse en cytométrie de flux de l'expression des molécules CD4 et CD8 sur les cellules mononuclées isolées du SNC des souris C57BL/6 (Ct), B7.2 Tg L27 (L27), B7.2 Tg L31 précliniques (Préclin. L31) et B7.2 Tg L31 symptomatiques (Sympt. L31) (A). Fréquence de cellules T parmi les cellules mononuclées isolées du SNC des souris C57BL/6 (Ct; n=6), B7.2 Tg L27 (L27; n=7), B7.2 Tg L31 précliniques (Préclin. L31; n=9) et B7.2 Tg L31 symptomatiques (Sympt. L31; n=6) (B). Fréquence de cellules T CD8⁺ parmi les cellules T totales isolées du SNC et de la rate des souris C57BL/6 (Ct; n=6), B7.2 Tg L27 (L27; n=7), B7.2 Tg L31 précliniques (Préclin. L31; n=9) et B7.2 Tg L31 symptomatiques (Sympt. L31; n=6) (C).

Figure 7

A



B



C

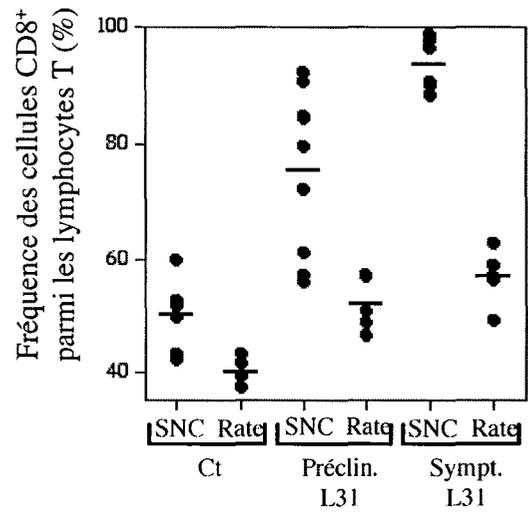
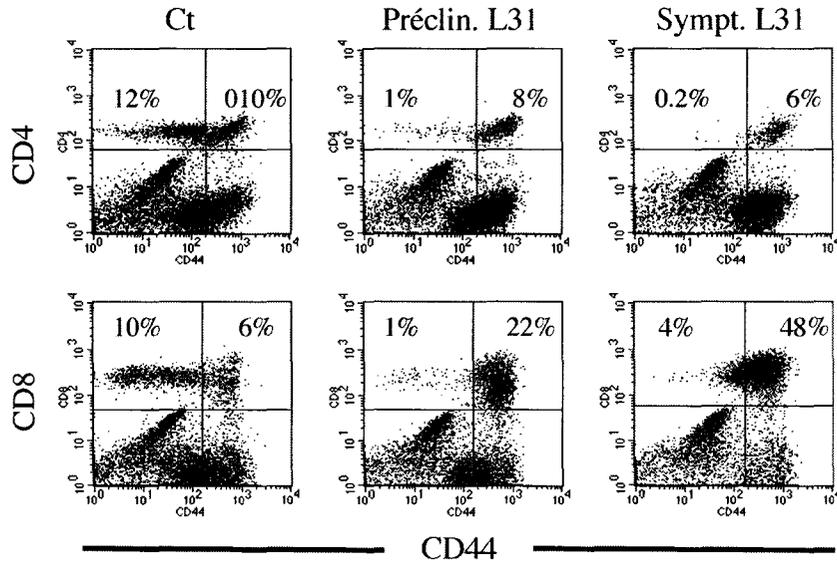


Fig.8 Niveau d'expression élevé de la molécule CD44 sur les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ infiltrant le SNC des souris B7.2 Tg L31.

Analyse en cytométrie de flux de l'expression de la molécule CD44 sur les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ isolées du SNC (A) et des ganglions lymphatiques (B) de souris C57BL/6 (Ct), B7.2 Tg L31 précliniques (Préclin. L31) et B7.2 Tg L31 symptomatiques (Sympt. L31). Ces résultats sont représentatifs de 4 expériences indépendantes.

Figure 8

A



B

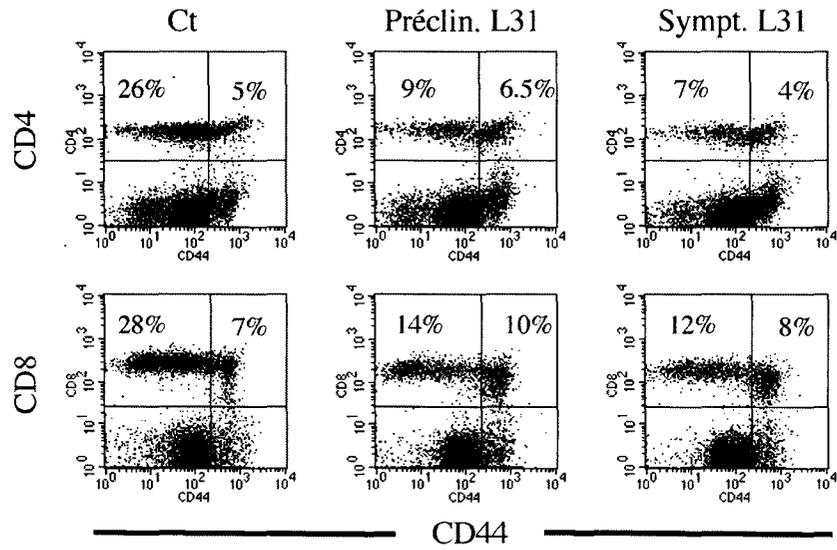
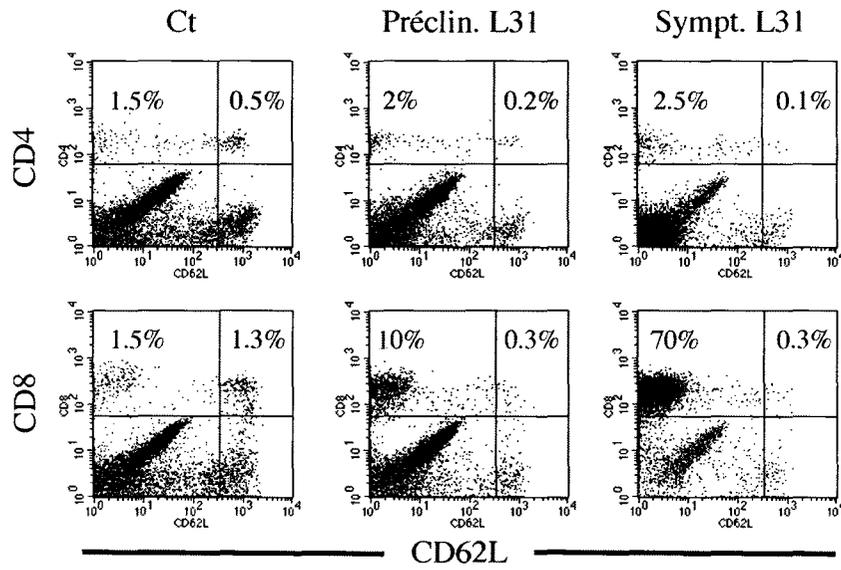


Fig.9 Faible niveau d'expression de la molécule CD62L sur les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ infiltrant le SNC des souris B7.2 Tg L31.

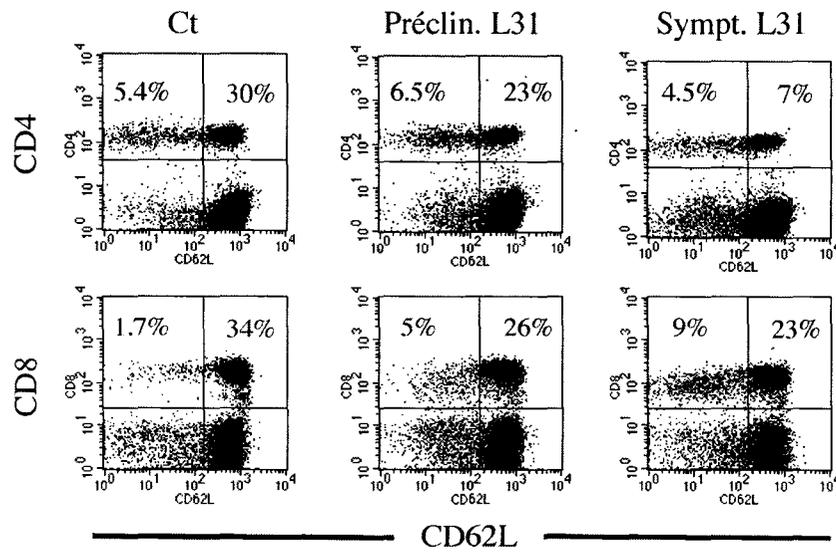
Analyse en cytométrie de flux de l'expression de la molécule CD62L sur les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ isolées du SNC (A) et des ganglions lymphatiques (B) de souris C57BL/6 (Ct), B7.2 Tg L31 précliniques (Préclin. L31) et B7.2 Tg L31 symptomatiques (Sympt. L31). Ces résultats sont représentatifs de 4 expériences indépendantes.

Figure 9

A



B



des marqueurs caractérisant une population de cellules T mémoires/effectrices. La quasi-totalité des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ isolées du SNC des souris B7.2 Tg L31 précliniques et symptomatiques expriment de hauts niveaux de molécules CD44 (Fig. 8A) et de bas niveaux de molécules CD62L (Fig. 9A), un phénotype caractéristique des cellules T mémoires/effectrices (CD44^{élevé} CD62L^{faible}). On note également une légère augmentation de la fréquence de cellules T mémoires/effectrices dans les ganglions lymphatiques des souris B7.2 Tg L31 précliniques et symptomatiques comparativement aux souris C57BL/6 (Fig. 8B et 9B). Les souris B7.2 Tg L27, qui ne développent pas de pathologie neurologique, présentent exactement la même augmentation de fréquence de cellules T mémoires/effectrices en périphérie que les souris B7.2 Tg L31 (Fournier S. et al. 1997). Les cellules T isolées du SNC des souris B7.2 Tg L31 n'expriment pas le marqueur d'activation précoce CD25 (résultat non montré).

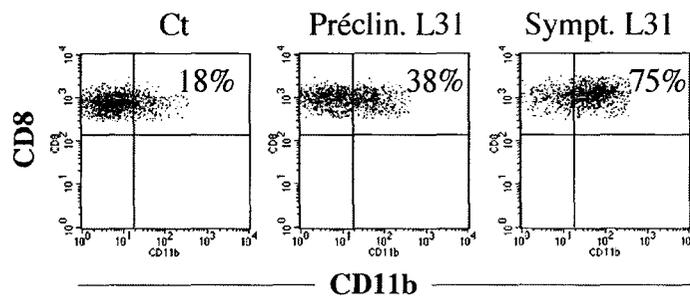
Comme les marqueurs phénotypiques CD44 et CD62L ne permettent pas de différencier les cellules T mémoires des cellules T effectrices, nous avons utilisé des marqueurs ainsi que des essais fonctionnels plus spécifiques aux cellules T effectrices. Nous avons observé qu'un pourcentage élevé de cellules T CD8⁺ infiltrant le SNC des souris B7.2 Tg L31 expriment des niveaux intermédiaires de CD11b/Mac-1, un marqueur qui définit les cellules T CD8⁺ effectrices récemment activées (Christensen J. E. et al. 2001) (Fig. 10A). La proportion de cellules T CD8⁺ isolées du SNC qui expriment CD11b/Mac-1 passe de 19% ± 1% chez les souris C57BL/6 à 39% ± 1% chez les souris B7.2 Tg L31 précliniques puis à 67% ± 11% chez les souris B7.2 Tg L31 symptomatiques. Une forte production d'IFN γ est une caractéristique phénotypique fonctionnelle des cellules effectrices T_C1 pro-inflammatoires (Sad S. et al. 1995). La

Fig.10 Niveau d'expression de la molécule CD11b et production intracellulaire d'IFN γ des cellules T CD8⁺ isolées du SNC des souris B7.2 Tg L31.

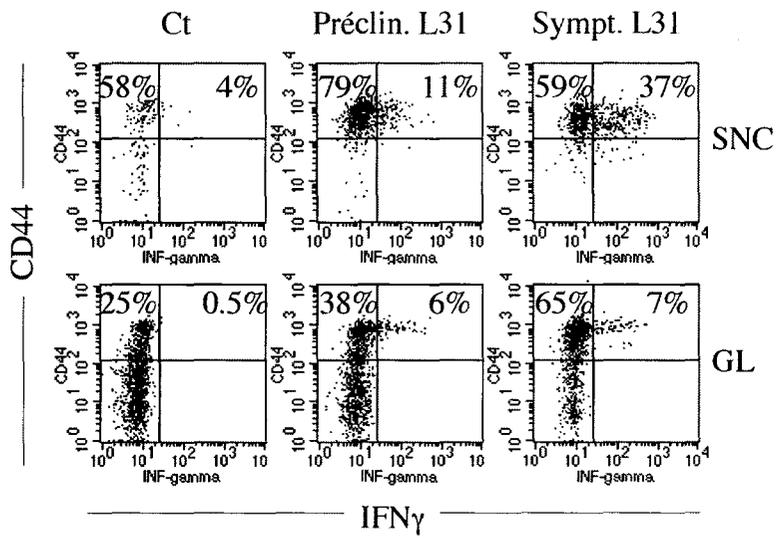
Analyse en cytométrie de flux de l'expression de la molécule CD11b sur les cellules T CD8⁺ isolées du SNC de souris C57BL/6 (Ct), B7.2 Tg L31 précliniques (Préclin. L31) et B7.2 Tg L31 symptomatiques (Sympt. L31) (A). Analyse en cytométrie de flux de la production intracellulaire d'IFN γ et de l'expression de CD44 par les cellules T CD8⁺ isolées des ganglions lymphatiques (GL) et du SNC de souris C57BL/6 (Ct), B7.2 Tg L31 précliniques (Préclin. L31) et B7.2 Tg L31 symptomatiques (Sympt. L31) après une stimulation *ex vivo* de 3 heures avec anti-CD3 immobilisé (B). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Figure 10

A



B

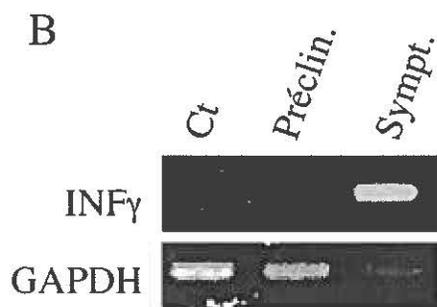
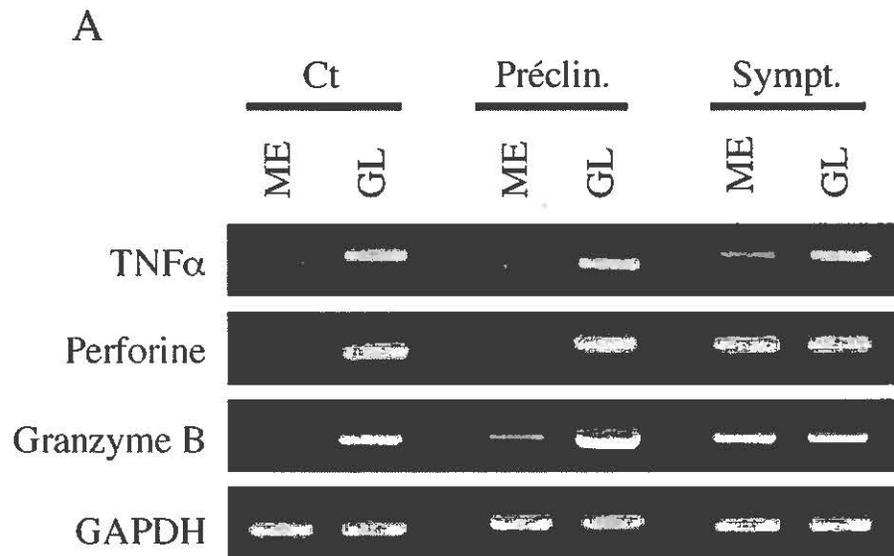


fréquence de cellules T CD8⁺ productrices d'IFN γ isolées du SNC et des ganglions lymphatiques de souris C57BL/6, de souris B7.2 Tg L31 précliniques et de souris B7.2 Tg L31 symptomatiques a été mesurée (Fig. 10B). La fréquence de cellules T CD8⁺ CD44^{élevé} productrices d'IFN γ isolées du SNC est invariablement plus élevée chez les souris B7.2 Tg L31 comparativement aux souris C57BL/6. Le SNC des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques montrent une fréquence plus élevée de cellules T CD8⁺ CD44^{élevé} productrices d'IFN γ comparativement au SNC des souris B7.2 Tg L31 précliniques (31% \pm 8% vs 13% \pm 2% respectivement). D'autre part, la fréquence de cellules T CD8⁺ CD44^{élevé} productrices d'IFN γ est significativement plus élevée dans le SNC que dans les tissus lymphoïdes périphériques chez les souris B7.2 Tg L31 symptomatiques (Fig. 10B), suggérant que les cellules T CD8⁺ sont activées à l'organe cible, soit le tissu nerveux. Des analyses par RT-PCR ont été conduites sur l'ARNm extrait du SNC et des ganglions lymphatiques provenant de souris C57BL/6 ainsi que de souris B7.2 Tg L31 précliniques et symptomatiques (Fig. 11). Nous avons détecté des niveaux élevés de transcrits codant pour l'IFN γ dans la moelle épinière et les ganglions spinaux des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques (Fig. 11A et 11B). Différents ARNm codant pour des molécules effectrices des cellules T CD8⁺ cytotoxiques comme la perforine et granzyme B ainsi que la cytokine pro-inflammatoire TNF- α ont été détectés dans la moelle épinière des souris B7.2 Tg L31, les niveaux augmentant avec les manifestations cliniques (Fig 11A). Collectivement, ces résultats démontrent clairement que l'accumulation de cellules T CD8⁺ mémoires/effectrices dans le système nerveux corrèle avec l'état symptomatique observé chez les souris B7.2 Tg L31.

Fig.11 Détection de l'ARNm encodant des molécules inflammatoires et cytotoxiques au SN des souris B7.2 Tg L31.

Analyse de l'expression relative de l'ARNm encodant la cytokine inflammatoire $TNF\alpha$ et les molécules cytotoxiques perforine et granzyme B, par RT-PCR à partir de l'ARN messenger isolé de la moelle épinière (ME) et des ganglions lymphatiques (GL) de souris C57BL/6 (Ct), B7.2 Tg L31 précliniques (Préclin. L31) et B7.2 Tg L31 symptomatiques (Sympt. L31) (A). Analyse de l'expression relative de l'ARNm de l' $IFN\gamma$ par RT-PCR à partir de l'ARN messenger isolé des ganglions spinaux de souris C57BL/6 (Ct), B7.2 Tg L31 précliniques (Préclin. L31) et B7.2 Tg L31 symptomatiques (Sympt. L31) (B).

Figure 11



3.0.4 La molécule de costimulation B7.2 est exprimée de façon constitutive dans le système nerveux des souris B7.2 Tg L31

L'infiltration leucocytaire observée chez les souris B7.2 Tg L31 étant clairement restreinte au niveau du SN, nous avons vérifié le niveau d'expression de la molécule B7.2 dans le SN des souris B7.2 Tg L31 ainsi que dans le SN des souris B7.2 Tg L27 qui ne développent aucun symptôme neurologique. Dans les souris B7.2 Tg L31, l'expression de la molécule B7.2 a été détectée par immunohistochimie dans le parenchyme de la moelle épinière sur des cellules morphologiquement similaires aux cellules de la microglie et également détectée dans les ganglions spinaux sur des cellules ayant une morphologie plutôt arrondie et amoeboïde (Fig. 12A). Nous avons utilisé la cytométrie de flux pour caractériser les sous-populations cellulaires exprimant la molécule B7.2 dans le système nerveux. Les leucocytes infiltrants et les cellules myéloïdes résidentes peuvent être discriminés selon l'expression relative des molécules CD45 et CD11b/Mac-1 (Sedgwick J. D. et al. 1991). Les lymphocytes T ($CD45^{\text{élevé}} CD11b^{\text{nul}}$), les macrophages ($CD45^{\text{élevé}} CD11b^+$) et la microglie ($CD45^{\text{faible}} CD11b^+$) peuvent donc être caractérisés suite à leur isolation du SNC. La molécule B7.2 est exprimée fortement sur les cellules de la microglie ($CD45^{\text{faible}} CD11b^+$) des souris B7.2 Tg L31 précliniques et symptomatiques (Fig. 12B). À l'opposé, les niveaux d'expression de la molécule B7.2 sur la microglie des souris B7.2 Tg L27 sont comparables à ceux observés chez les souris C57BL/6 (Fig. 12B). Chez de jeunes souris B7.2 Tg L31 (3-4 semaines) qui montrent une fréquence de cellules T dans le SNC comparable à celle observée chez les souris de type sauvage, les cellules de la microglie expriment des niveaux de la molécule B7.2 identiques à ceux observés chez les souris B7.2 Tg L31

Fig. 12 Expression de la molécule B7.2 au SN des souris B7.2 Tg L31 précliniques et symptomatiques.

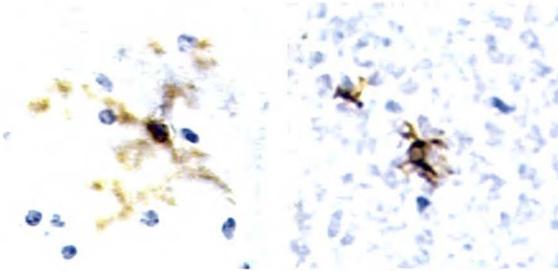
Marquages immunohistochimiques pour la molécule B7.2 effectués sur des sections de moelle épinière et de ganglion spinal d'une souris B7.2 Tg L31 préclinique montrant l'expression de B7.2 sur des cellules isolées à la morphologie microgliale (A). Analyse en cytométrie de flux de l'expression de B7.2 et de CD45 par les cellules CD11b⁺ isolées du SNC des souris C57BL/6 (Ct), B7.2 Tg L27 (L27), B7.2 Tg L31 précliniques (Préclin. L31) et B7.2 Tg L31 symptomatiques (Sympt. L31) toutes âgées de 3 mois (B). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Figure 12

A

Moelle
épinière

Ganglion
spinal



B

Souris âgées de 3 mois

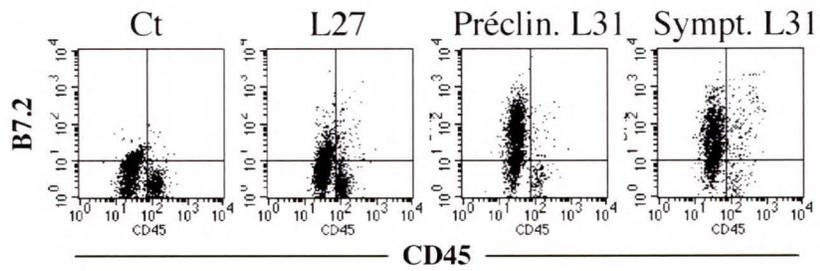


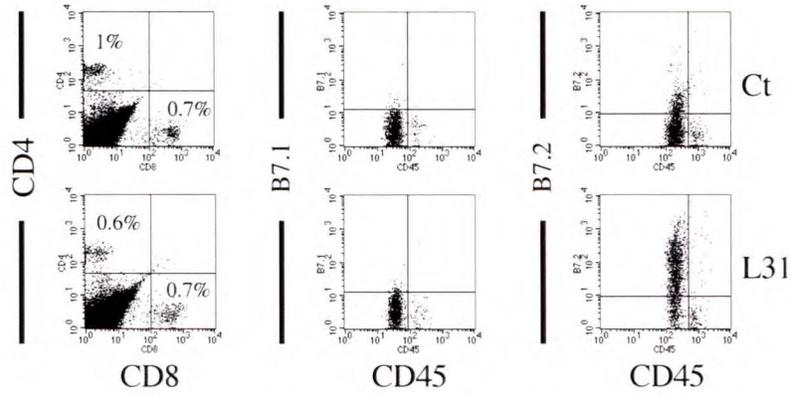
Fig.13 Expression constitutive de la molécule B7.2 dans le SN des souris B7.2 Tg L31.

Analyse en cytométrie de flux de l'expression des molécules CD4 et CD8 par les cellules isolées du SNC de souris C57BL/6 (Ct) et B7.2 Tg L31 âgées de 4 semaines (L31) ainsi que l'expression des molécules B7.1, B7.2 et CD45 par les cellules CD11b⁺ isolées du SNC des C57BL/6 (Ct) et B7.2 Tg L31 âgées de 4 semaines (L31) (A). Marquages immunohistochimiques pour la molécule B7.2 effectués sur des sections de moelle épinière et de ganglion spinal d'une souris TCRβ^{-/-} B7.2 Tg L31 montrant l'expression de B7.2 sur des cellules isolées à la morphologie microgliale (B). Analyse en cytométrie de flux de l'expression des molécules B7.2 et CD45 par les cellules CD11b⁺ isolées du SNC des souris C57BL/6 TCRβ^{-/-} (Ct), TCRβ^{-/-} B7.2 Tg L27 (L27) et TCRβ^{-/-} B7.2 Tg L31 (L31) toutes âgées de 3 mois (C). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Figure 13

A

Souris âgées de 3-4 semaines



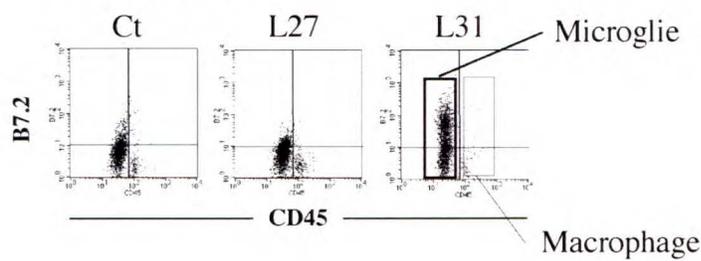
B

Moelle épinière Ganglion spinal



C

Souris TCR β $-/-$



adultes (12 semaines) (Fig. 13A). L'homologue B7.1, dont l'expression est connue pour être augmentée sur les cellules de la microglie activées (Issazadeh S. et al. 1998, Lyons J. A. et al. 1999) n'est pas exprimé sur les cellules CD45^{faible} CD11b⁺ des jeunes souris B7.2 Tg L31 (Fig. 13A). Ces résultats suggèrent que l'expression de la molécule B7.2 par la microglie est indépendante de l'état d'activation de la microglie et antérieure à l'infiltration des lymphocytes T.

Des études ont suggéré que la microglie pouvait s'activer en réponse à une inflammation périphérique (Rivest S. et al. 2000). Pour exclure la possibilité que l'augmentation d'expression de la molécule B7.2 observée sur la microglie des souris B7.2 Tg L31 serait le reflet d'une inflammation périphérique induite par les lymphocytes T transgéniques, nous avons généré des souris B7.2 Tg sans aucun lymphocyte T exprimant un TCR α/β (souris TCR β ^{-/-} B7.2 Tg L31). Les analyses immunohistochimiques ont révélé que la molécule B7.2 est exprimée sur des cellules morphologiquement similaires à la microglie et sur des cellules de morphologie amoéboïde dans le parenchyme de la moelle épinière et dans les ganglions spinaux des souris TCR β ^{-/-} B7.2 Tg L31 (Fig. 13B). Les analyses en cytométrie de flux démontrent que les niveaux d'expression de la molécule B7.2 sur les cellules de la microglie CD45^{faible} CD11b⁺ des souris TCR β ^{-/-} B7.2 Tg L31 sont aussi élevés que ceux observés dans les souris TCR β ^{+/+} B7.2 Tg L31 (Fig. 13C). Ces résultats démontrent que la molécule B7.2 est constitutivement exprimée sur les cellules de la microglie du SNC des souris B7.2 Tg L31.

3.0.5 Les lymphocytes T transgéniques et l'expression de la molécule B7.2 dans le système nerveux sont requis pour l'induction de la pathologie

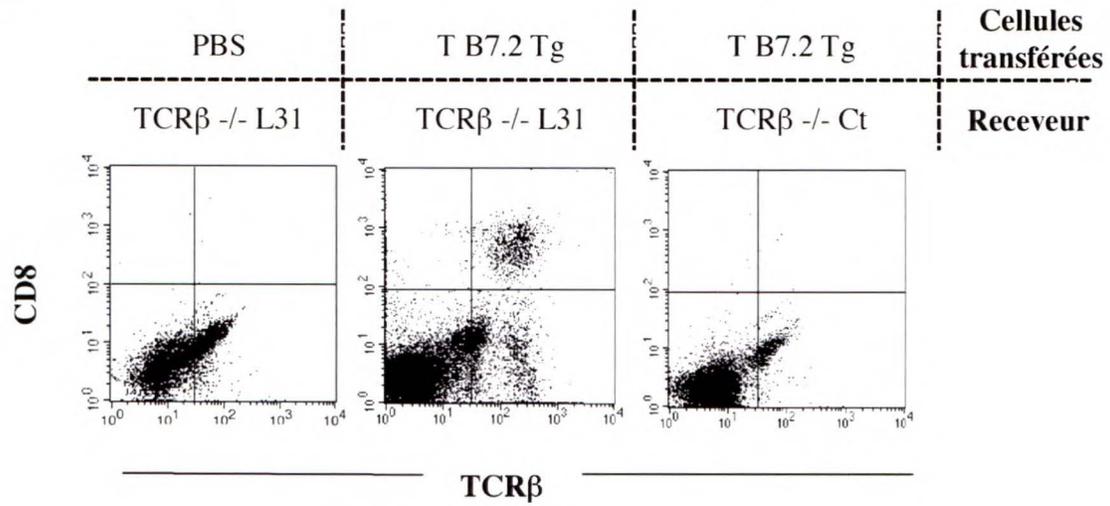
Les souris TCR β $-/-$ B7.2 Tg L31 n'ont jamais montré de symptômes neurologiques (n=27), et ce sur une période de 12 mois. De plus, des analyses histologiques ont démontré l'absence d'infiltrats de cellules mononuclées dans la moelle épinière ainsi que dans les ganglions spinaux des souris TCR β $-/-$ B7.2 Tg L31 âgées de 3 mois (Fig. 2J-L). Ces résultats démontrent que les cellules T qui expriment un TCR α/β sont requises pour le développement de la pathologie affectant le système nerveux des souris B7.2 Tg L31. Pour déterminer le rôle de l'expression constitutive de la molécule B7.2 au système nerveux dans le développement de la pathologie neurologique, des expériences de transferts adoptifs ont été conduites. Des cellules T isolées de la rate et de ganglions lymphatiques de souris B7.2 Tg L31 ont été transférées dans des souris TCR β $-/-$ B7.2 Tg L31 ou des souris TCR β $-/-$ C57BL/6. Deux mois après transfert, 7 des 8 souris TCR β $-/-$ B7.2 Tg L31 ayant reçu des cellules T isolées d'une souris B7.2 Tg L31 ont montré de légers symptômes cliniques (faiblesse des membres inférieurs ainsi qu'un manque de coordination lors de déplacements sur les barreaux métalliques de la cage). Aucun symptôme neurologique n'a été observé chez les souris receveuses TCR β $-/-$ C57BL/6 ayant reçu des cellules T isolées d'une souris B7.2 Tg L31 (n=6). Les infiltrats cellulaires isolés des SNCs prélevés sur les différentes souris receveuses ont été analysés en cytométrie de flux. Suite au transfert de cellules T isolées d'une souris B7.2 Tg L31 chez des souris receveuses TCR β $-/-$ B7.2 Tg L31 ou TCR β $-/-$ C57BL/6, des cellules T exprimant la chaîne β du TCR ont été détectés uniquement dans le SNC des souris receveuses TCR β $-/-$ B7.2 Tg L31 (Fig. 14A). Un marquage immunohistochimique pour

Fig.14 L'expression constitutive de la molécule B7.2 dans le SNC est nécessaire pour le transfert de la pathologie par les lymphocytes T transgéniques.

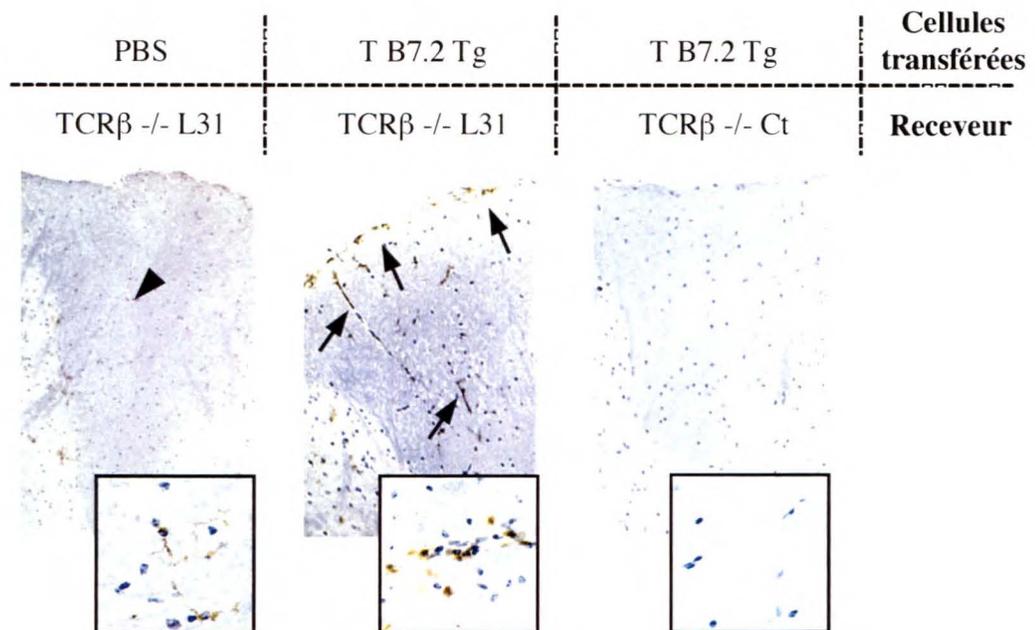
Huit semaines après le transfert adoptif de 20×10^6 cellules T isolées à partir de la rate et de ganglions lymphatiques d'une souris B7.2 Tg L31 âgées de 3 mois, les cellules mononuclées isolées du SNC des souris TCR β $-/-$ B7.2 Tg L31 et C57BL/6 TCR β $-/-$ ayant reçu des cellules T B7.2 Tg furent analysées en cytométrie de flux pour l'expression des molécules TCR β et CD8 et comparées à une souris TCR β $-/-$ B7.2 Tg L31 ayant reçu du PBS (A). Marquages immunohistochimiques pour la molécule B7.2 effectués sur des sections de moelle épinière d'une souris TCR β $-/-$ B7.2 Tg L31 ayant reçu du PBS, d'une souris TCR β $-/-$ B7.2 Tg L31 ayant reçu des cellules T B7.2 Tg et d'une souris C57BL/6 TCR β $-/-$ ayant reçu des cellules T B7.2 Tg (B). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Figure 14

A



B



la molécule B7.2, constitutivement exprimée par les cellules T Tg, révèle la présence d'infiltrats lymphocytaires dans le SNC des souris receveuses TCR β -/- B7.2 Tg L31. Aucune infiltration ne survient dans le SNC des souris receveuses TCR β -/- C57BL/6 (Fig. 14B). Des cellules T isolées de la rate et de ganglions lymphatiques de souris C57BL/6 qui sont ensuite transférées dans des souris receveuses TCR β -/- B7.2 Tg L31 (n=5) n'ont induit aucun symptôme clinique (n=5) ou infiltration de cellules T dans le SNC (résultat non montré). Ces résultats indiquent clairement que le processus de démyélinisation spontanée observé chez les souris B7.2 Tg L31 est induit par les cellules T et que l'expression constitutive de la molécule B7.2 sur les cellules résidentes du SNC est requise pour le développement de la pathologie.

4.0 Résultats (section 2)

Les travaux présentés dans cette section ont été proposés sous la forme d'un article au *Journal of Immunology* à l'automne 2005, article qui a été accepté avec révisions. Je suis le premier auteur de cet article. Ma contribution directe aux résultats présentés est intégrale pour toutes les figures à l'exception des études immunohistochimiques (Fig. 16) où ma contribution directe se limite aux croisements des souris utilisées, les perfusions intra-cardiaques, les prélèvements des organes et leur inclusion dans une solution préservative. Voici un rappel des objectifs visés dans cette section;

- i) définir les rôles respectifs des cellules T CD8⁺ et CD4⁺ dans la pathologie observée,
- ii) effectuer l'analyse du répertoire des cellules T CD8⁺ infiltrées au système nerveux des souris B7.2 Tg L31,
- iii) étudier l'état d'activation de la microglie avant et après l'apparition des symptômes neurologiques et,
- iv) déterminer le rôle joué par la cytokine IFN γ , une cytokine produite par les lymphocytes T CD8⁺ activés, dans le développement de la pathologie.

4.0.1 Pathogenèse accélérée chez les souris B7.2 Tg L31 déficientes en cellules T CD4⁺

Pour étudier la contribution relative des deux sous-populations de cellules T dans la pathologie observée, nous avons produit des souris B7.2 Tg L31 déficientes pour la génération de cellules T CD4⁺ en croisant les souris B7.2 Tg L31 avec des souris portant

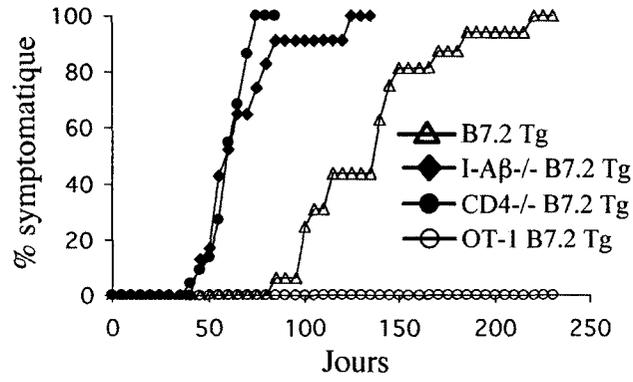
une délétion dans le gène encodant la chaîne β de la molécule I-A du CMH II (souris I-A β -/-) (Grusby M. J. et al. 1991). Les souris B7.2 Tg L31 étant sur la base génétique C57BL/6 dans laquelle l'expression de la molécule I-E du CMH II est compromise, les souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 ont un défaut majeur pour la différenciation thymique des cellules T CD4⁺ et seulement 3-4% de cellules T CD4⁺ sont trouvées dans les ganglions lymphatiques périphériques (Grusby M. J. et al. 1991). Les souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 démontrent exactement les mêmes symptômes neurologiques que les souris I-A β +/- B7.2 Tg L31: rétraction des membres inférieurs lorsque la souris est soulevée par la queue, flaccidité de la queue ainsi qu'un manque de coordination et de proprioception lors des déplacements sur les barreaux métalliques de la cage. Ces symptômes surviennent cependant significativement plus rapidement chez les souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 que chez les souris I-A β +/- B7.2 Tg L31 (Fig. 15A). Chez les souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 (n = 23), les premiers signes cliniques apparaissent à l'âge de 59 ± 10 jours tandis que les souris B7.2 Tg L31 présentent les premiers signes cliniques à l'âge de 133 ± 26 jours (p<0.001). L'effet observé de l'absence de cellules T CD4⁺ sur le développement de la pathologie a été confirmé par le croisement des souris B7.2 Tg L31 avec des souris déficientes pour la molécule CD4 (souris CD4 -/-) qui a produit des souris CD4 -/- B7.2 Tg L31 démontrant la même pathologie accélérée (66 ± 20 jours, n = 20) (Fig. 15A). Les analyses en cytométrie de flux révèlent que la fréquence de cellules T CD8⁺ dans le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 est systématiquement plus élevée que celle observée chez les souris I-A β +/- B7.2 Tg L31 de même âge (Fig. 15B), démontrant une accumulation/expansion accélérée des cellules T CD8⁺ dans le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 comparativement au souris I-A β +/- B7.2 Tg L31. Le déclenchement

Fig. 15 Pathogenèse accélérée chez les souris B7.2 Tg L31 déficientes pour les cellules T CD4⁺.

L'état clinique des souris B7.2 Tg L31 (n = 31), I-A β -/- B7.2 Tg L31 (n = 23), CD4 -/- B7.2 Tg L31 (n = 20) et OT-1 TCR Tg B7.2 Tg L31 (n = 19) a été évalué chaque semaine sur une période de 8 mois pour établir la fréquence de souris présentant une rétraction des membres postérieurs lorsque maintenues par la queue (A). Analyse en cytométrie de flux de la fréquence de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ isolées à partir du SNC de souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 et I-A β +/+ B7.2 Tg L31 âgées de 4, 6 et 8 semaines (B). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Figure 15

A



B

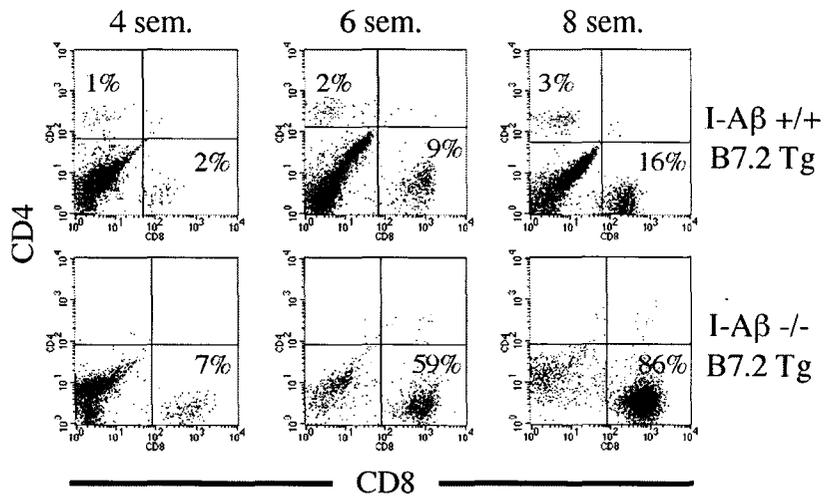
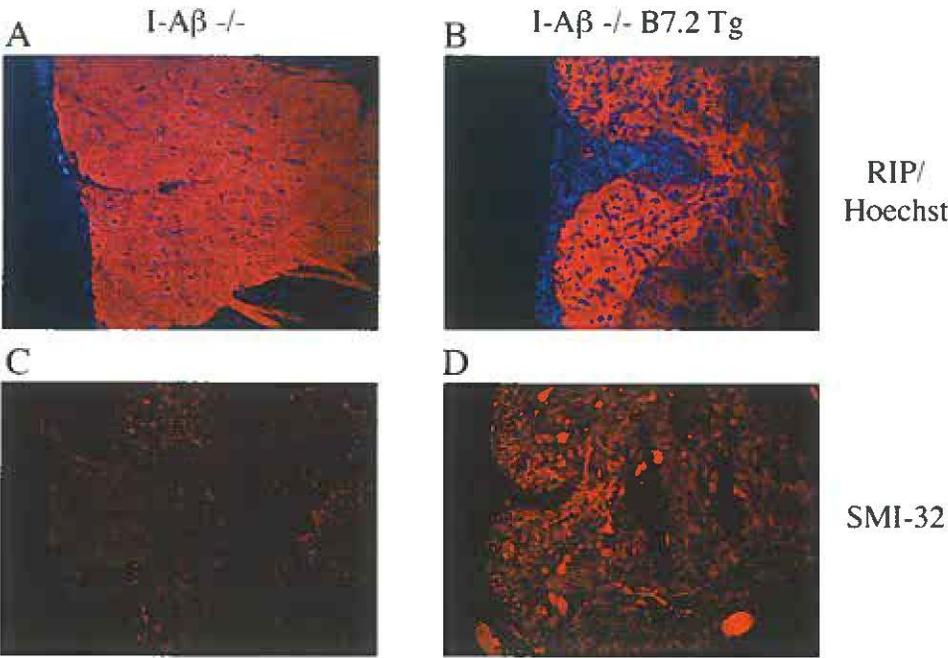


Fig.16 Démyélinisation et dommages axonaux spontanés dans le SNC de souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatiques.

Sections tissulaires provenant de la moelle épinière d'une souris I-A β -/- Ct (A, C) et d'une souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatique (B, D) marquées avec la combinaison du colorant Hoeschst (bleu) et d'un anticorps monoclonal RIP (rouge) spécifique pour la myéline (A, B) ou marquées avec l'anticorps SMI-32 (rouge) spécifique pour les neurofilaments de type H déphosphorylés (C, D).

Figure 16



hâtif des symptômes neurologiques chez les souris dépourvues de cellules T CD4⁺ corrèle donc avec l'accumulation/expansion accélérée des cellules T CD8⁺ dans le SNC. Nous avons également vérifié si les symptômes neurologiques observés étaient aussi associés à une démyélinisation au niveau du SNC des souris déficientes en cellules T CD4⁺. Des sections de moelle épinière de souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatiques et I-A β -/- C57BL/6 ont été immuno-marquées avec l'anticorps RIP spécifique pour la myéline qui marque le corps et les extensions cellulaires des oligodendrocytes matures. Les sections ont été contre-marquées avec le colorant nucléaire Hoesht, permettant la visualisation de l'infiltrat cellulaire. Les analyses en immunofluorescence révèlent une perte notable de cellules RIP⁺ dans la moelle épinière des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatiques, particulièrement dans les zones où les infiltrats cellulaires sont les plus nombreux (Fig. 16B). Les dommages axonaux ont également été évalués en utilisant l'anticorps SMI-32 qui est spécifique pour les neurofilaments H déphosphorylés, un indicateur sensible d'une perturbation axonale (Gilgun-Sherki Y. et al. 2003, Pitt D. et al. 2000, Werner P. et al. 2000). On peut observer plusieurs régions positives pour l'anticorps SMI-32 dans les sections de moelle épinière de la souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatique, indiquant des dommages axonaux significatifs (Fig. 16D). Les sections de moelle épinière des souris I-A β -/- C57BL/6 présentent une présence uniforme de cellules RIP⁺ sans infiltrats cellulaires et ne montrent aucun marquage significatif pour l'anticorps SMI-32 (Fig. 16A et 17C). Collectivement, ces résultats indiquent que la pathologie associée à la démyélinisation du SNC chez les souris B7.2 Tg L31 est une pathologie induite par les cellules T CD8⁺ et que les cellules T CD4⁺ ont un rôle immunorégulateur.

4.0.2 Inhibition de la pathogenèse chez les souris B7.2 Tg L31 par la restriction du répertoire des cellules T

Nous avons voulu vérifier si le développement des symptômes neurologiques chez les souris B7.2 Tg L31 nécessitait une stimulation antigénique des cellules T via leur TCR ou si leur recrutement et leur activation dans le SNC étaient indépendants de toute reconnaissance antigénique spécifique au tissu infiltré. Dans ce dessein, nous avons restreint le répertoire des souris B7.2 Tg L31 en les croisant avec des souris OT-1 TCR Tg. Les souris OT-1 TCR Tg ont une fréquence élevée (~95%) de cellules T CD8⁺ clonotypiques (V α 2⁺ V β 5⁺) et la population de cellules T CD4⁺ est fortement diminuée comparativement à des souris C57BL/6 (Hogquist K. A. et al. 1994). Le TCR transgénique OT-1 reconnaît spécifiquement le peptide 254-267 de l'ovalbumine, un antigène qui n'est manifestement pas exprimé dans le SNC. Comme rapporté, les souris OT-1 Tg et OT-1 B7.2 Tg L31 ont toutes une fréquence très élevée de cellules T CD8⁺ V α 2⁺ dans les ganglions lymphatiques périphériques (Fig. 17A).

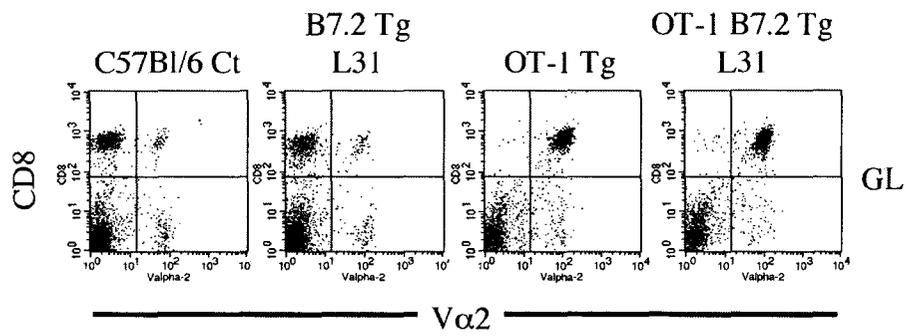
Les souris OT-1 B7.2 Tg L31 (n=20) maintenues dans la colonie pendant 12 mois n'ont jamais développé de symptômes neurologiques. Nous avons isolé les cellules mononuclées du SNC de souris OT-1 B7.2 Tg L31 âgées de 5 mois, âge auquel les souris B7.2 Tg L31 montrent une infiltration importante de cellules T CD8⁺ dans le SNC, pour analyser en cytométrie de flux la fréquence de cellules T présentes. La fréquence de cellules T CD8⁺ dans le SNC est remarquablement plus élevée chez les souris B7.2 Tg L31 comparativement aux souris C57BL/6 et aux souris OT-1 B7.2 Tg L31 (Fig. 17B). Aucune différence significative dans la fréquence des cellules T CD8⁺ dans le SNC n'a été observée entre les souris OT-1 Tg, les souris OT-1 B7.2 Tg L31 et les souris

Fig. 17 Absence de cellules T CD8⁺ infiltrantes au SNC de souris OT-1 TCR Tg B7.2 Tg L31.

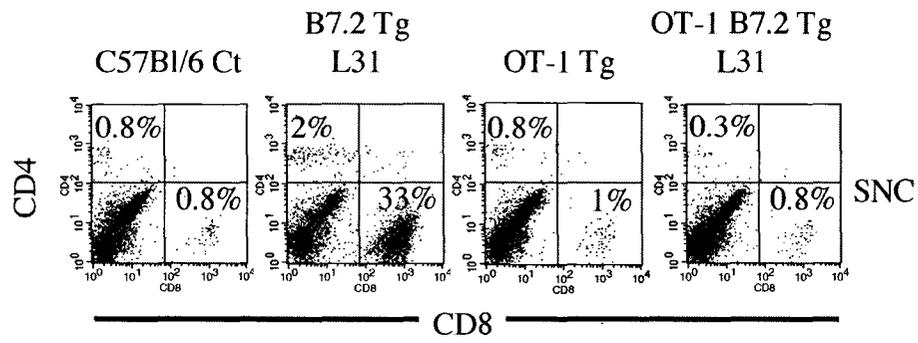
Analyse en cytométrie de flux de l'expression des molécules CD8 et de V α 2 sur les cellules isolées à partir des ganglions lymphatiques (GL) de souris C57BL/6 (Ct), B7.2 Tg L31 (L31), OT-1 TCR Tg (OT-1), OT-1 TCR Tg B7.2 Tg L31 (OT-1 L31) âgées de 5 mois (A). Analyse en cytométrie de flux de la fréquence de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ isolées du SNC de souris C57BL/6 (Ct), B7.2 Tg L31 (L31), OT-1 TCR Tg (OT-1), OT-1 TCR Tg B7.2 Tg L31 (OT-1 L31) âgées de 5 mois (B). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Figure 17

A



B



C57BL/6 (Fig. 17B). Ces résultats démontrent que le phénomène d'infiltration des cellules T CD8⁺ dans le SNC des souris B7.2 Tg n'est pas indépendant de toute reconnaissance antigénique et qu'un répertoire polyclonal est requis pour l'expansion/accumulation des cellules T CD8⁺ dans le SNC des souris B7.2 Tg L31 ainsi que pour le développement spontané des manifestations cliniques.

4.0.3 Analyse du répertoire TCR des cellules T CD8⁺ infiltrées dans le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31

De façon à mieux caractériser et à mieux comprendre la nature de l'accumulation/expansion des cellules T CD8⁺ dans le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31, nous avons analysé la distribution des tailles des transcrits de la troisième région hypervariable (CDR3) des chaînes variables β (V β) des TCR isolés de la moelle épinière par la méthode de l'immunoscope des CDR3. Une reconnaissance de neuroantigènes spécifiques par les cellules T CD8⁺ trouvées dans le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 se traduirait par une distribution biaisée des tailles de la région CDR3 et constituerait un répertoire de lymphocytes T oligoclonal. Inversement, une distribution gaussienne des tailles de la région CDR3 reflèterait la présence d'un répertoire polyclonal et indiquerait que l'accumulation de cellules T CD8⁺ dans le SNC est aléatoire et indépendante de toute reconnaissance antigénique. L'immunoscope des CDR3 a été effectué pour 21 régions variables V β du TCR à partir des cDNAs obtenus des transcrits isolés de moelles épinières de souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 légèrement symptomatiques (souris âgées de 5 à 7 semaines) et sévèrement symptomatiques (souris âgées de 10 semaines).

L'immunoscope des régions CDR3 à partir des transcrits obtenus d'un pool de ganglions lymphatiques (brachiaux, inguinaux et axillaires) des mêmes animaux a été fait en parallèle pour permettre la comparaison entre le répertoire des cellules T CD8⁺ infiltrant le SNC et le répertoire des cellules T CD8⁺ périphériques. On peut voir à la figure 18 des exemples représentatifs de l'immunoscope des régions CDR3 effectués sur les cellules T CD8⁺ périphériques (Fig. 18A) et sur les cellules T CD8⁺ isolées à partir du SNC (Fig. 18B et 18C) de souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatiques. Les résultats de tous les immunoscopes obtenus sont résumés dans le tableau 1. L'analyse des immunoscopes des régions CDR3 des cellules T CD8⁺ infiltrant le SNC d'une souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 âgée de 7 semaines indique que plusieurs familles V β montrent une distribution biaisée (Fig. 18B). À l'inverse, les immunoscopes des régions CDR3 effectués sur les cellules T CD8⁺ périphériques du même animal montrent une distribution gaussienne pour toutes les familles V β (Fig. 18A) et indique que les cellules T CD8⁺ périphériques constituent un répertoire polyclonal. Ces résultats indiquent que l'accumulation/expansion des cellules T CD8⁺ dans le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 est sélective et non aléatoire durant le stade précoce de la pathogenèse.

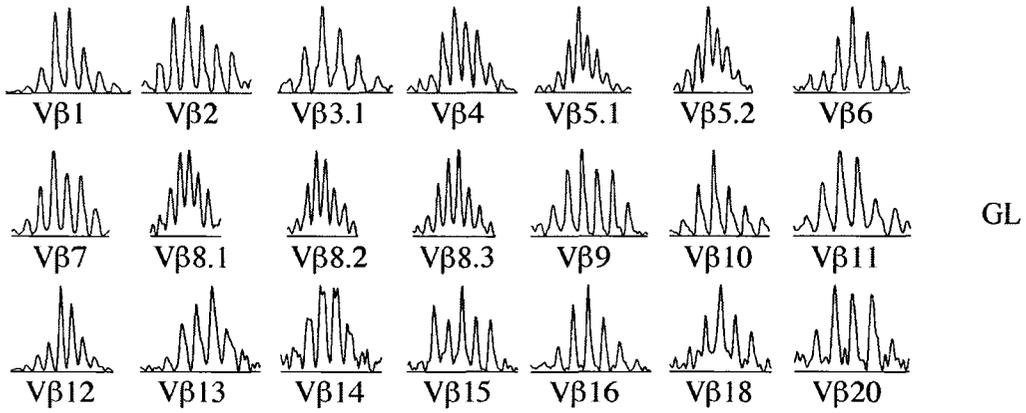
En comparant les distributions des tailles de la région CDR3 dans le SNC de souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 âgées de 10 semaines (Fig. 18C et Tableau 1) à celles obtenues chez les souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 âgées de 7 semaines (Fig. 18B et Tableau 1), nous avons observé que la fréquence de familles V β présentant une distribution gaussienne était significativement plus élevée ($p \leq 0.01$) au SNC des souris âgées de 10 semaines comparativement au SNC des souris âgées de 7 semaines (Tableau I). Ces

Fig. 18 Analyse du répertoire des cellules CD8⁺ infiltrant le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31.

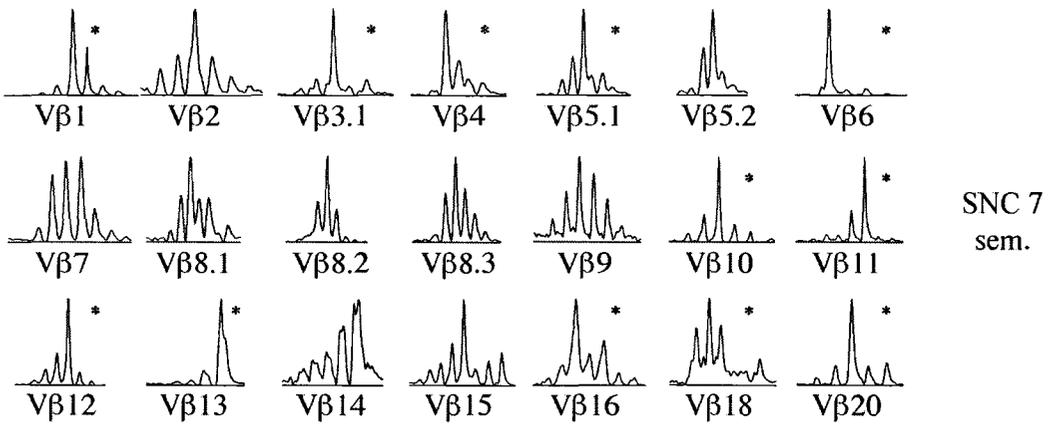
Distributions des tailles de la région CDR3 de la chaîne β du TCR des cellules T CD8⁺ obtenues des ganglions lymphatiques (GL) d'une souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatique âgée de 7 semaines (A) et du SNC de souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatiques âgées de 7 (B) et 10 semaines (C). Les distributions clairement biaisées sont indiquées par un astérisque.

Figure 18

A



B



C

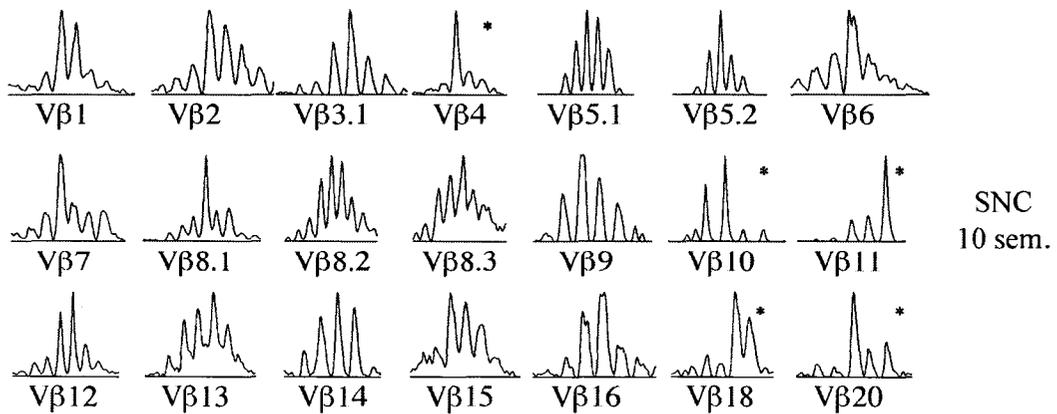


Tableau 1. Analyse cinétique de la distribution des tailles de la région CDR3 de la chaîne β du TCR des cellules T CD8⁺ présentes dans les ganglions lymphatiques (GL) et dans le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 âgées de 5, 7 et 10 semaines.

Tableau 1

(n)	Âge	GL		SNC		Sympt.
		% V β biaisé	No V β dét.	% V β biaisé	No V β dét.	
(3)	5 sem.	0	21	57 \pm 4	14 \pm 2	-
(5)	7 sem.	0	21	58 \pm 3	21 \pm 0.3	+
(3)	10 sem.	0	21	29 \pm 6 [‡]	21	+++

ⁿ
Nombre de souris analysée

[‡]
p \leq 0.01

résultats suggèrent que le répertoire de cellules T CD8⁺ présentes dans le SNC évolue avec la pathogenèse, passant d'un répertoire très restreint chez les souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 légèrement symptomatiques à un répertoire plus diversifié chez les souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 sévèrement symptomatiques. Les cellules T CD8⁺ périphériques des toutes les souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatiques montrent une distribution gaussienne des tailles CDR3 pour tous les V β testés (Tableau I), indiquant un répertoire périphérique polyclonal pour toutes les souris analysées et qui n'est pas altéré avec l'âge de la souris.

Pour déterminer si les V β démontrant une distribution biaisée des tailles CDR3 dans le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatiques représentent une population oligoclonale, nous avons cloné et séquencé les ADNc dérivés de familles V β présentant une distribution des tailles CDR3 biaisée et nous avons comparé ces séquences avec celles obtenues à partir de familles V β présentant une distribution gaussienne des tailles de la région CDR3 (Fig. 19). Les résultats obtenus de 5 souris sont résumés dans le tableau 2. Tous les clones dérivés des V β présentant une distribution gaussienne des tailles de la région CDR3 montrent des séquences peptidiques uniques, ce qui confirme la nature polyclonale de la population. Inversement, un clonotype prédominant a été identifié dans tous les cas de familles V β présentant une distribution des tailles de la région CDR3 nettement biaisée. En effet, chaque souris analysée affiche un clonotype surreprésenté parmi les ADNc clonés pour chaque famille V β biaisée. La souris M1 possède un clonotype constituant 81% (26/32) de tous les ADNc V β 6 clonés. Les autres souris analysées présentent toutes des clonotypes surreprésentés, leur représentation variant de 16% (5/32) à 53% (16/30) de tous les clones séquencés. Même si quelques

Fig. 19 Exemples de familles V β choisies pour le clonage et le séquençage de la région CDR3 de la chaîne β du TCR.

Familles V β choisies chez 3 souris I-A β $-/-$ B7.2 Tg L31 symptomatiques âgées de 7 semaines pour clonage et séquençage selon leurs distributions biaisées (V β 6 et V β 11 de la souris M1, V β 14 et V β 18 de la souris M2, V β 10 et V β 11 de la souris M3) et gaussiennes (V β 9 de la souris M1, V β 1 de la souris M2 et V β 8.1 pour la souris M3) des tailles du CDR3 de la chaîne β du TCR des cellules T CD8 $^{+}$ infiltrant le SNC.

Figure 19

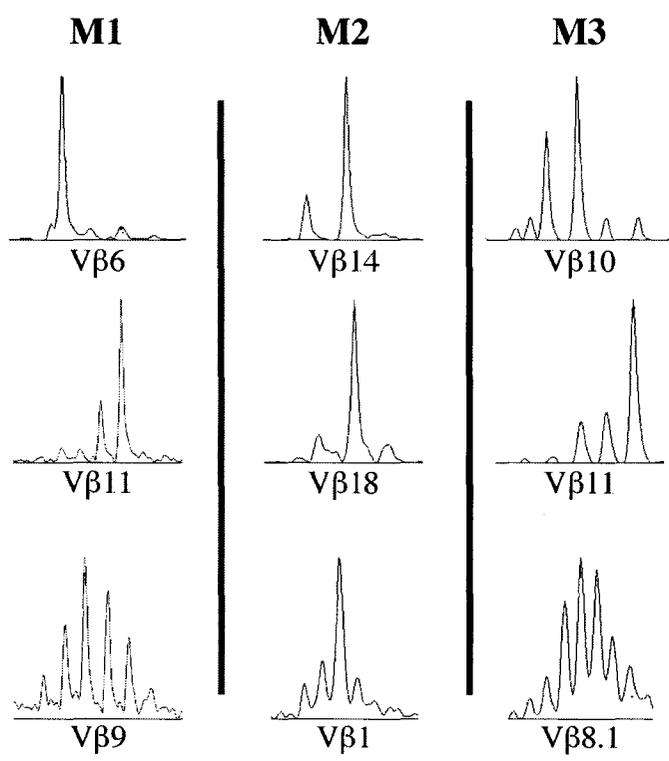


Tableau 2. Séquences amino-peptidiques de la région CDR3 de la chaîne β du TCR des cellules T CD8⁺ infiltrant le SNC de 5 souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatiques âgées de 7 semaines.

Tableau 2

M1					
Vβ-Jβ	(N)D(N)	Jβ	Taille	Fréquence	
6-1.3	CASS IDR	SGNTLY	10	26/32	
11-2.1	CASS VTGG	AEQF	8	5/28	
11-1.2	CASS LDGY	SDYT	8	4/28	
11-2.7	CASS WGTGP	YEQY	9	3/28	
11-2.1	CASS TGTGG	YAEQF	10	2/28	
11-2.1	CASS LVQL	AEQF	8	2/28	
9	CASS	séquences uniques		1/23	

M2					
Vβ-Jβ	(N)D(N)	Jβ	Taille	Fréquence	
14-2.7	CAWS LGWGV	EQY	8	16/30	
14-2.7	CAWS RDWG	YEQY	8	5/30	
14-2.7	CAWS RDWGG	YEQY	9	2/30	
14-2.7	CAWS RGV	EQY	6	2/30	
14-2.1	CAWS LGAH	AEQF	8	2/30	
18-2.1	CSS RDRGR	AEQF	9	11/29	
18-2.1	CSS LRDN	YAEQF	9	4/29	
18-2.7	CSS RIGG	SYEQY	9	4/29	
18-2.7	CSS SPDRV	YEQY	9	3/29	
18-2.7	CSS SPEPV	YEQY	9	2/29	
18-2.7	CSS SLGPT	YEQY	9	2/29	
1	CASS	séquences uniques		1/22	

M3					
Vβ-Jβ	(N)D(N)	Jβ	Taille	Fréquence	
11-1.1	CASS SGQY	TEVF	8	10/32	
11-2.3	CASS LPGGA	SAETLY	11	2/32	
11-2.7	CASS RGTG	YEQY	8	2/32	
11-2.1	CASS LHRY	YAEQF	9	2/32	
11-2.7	CASS RDWGN	YEQY	9	2/32	
10-2.7	CASS KIPPRN	YEQY	10	5/32	
10-2.1	CASS YYWGGE	AEQF	10	2/32	
8.1	CASS	séquences uniques		1/25	

M4					
Vβ-Jβ	(N)D(N)	Jβ	Taille	Fréquence	
10-1.2	CASS IRVA	NSDYT	9	13/26	
10-2.7	CASS DWGV	YEQY	8	4/26	
10-2.7	CASS SRLGG	YEQY	9	4/26	
10-2.1	CASS LLGY	YAEQF	9	2/26	

M5					
Vβ-Jβ	(N)D(N)	Jβ	Taille	Fréquence	
7-2.1	CASS YWAN	YAEQF	9	9/29	
7-2.1	CASS PGGN	YAEQF	9	7/29	
7-2.7	CASS PDI	YEQY	7	3/29	
7-2.7	CASS LFWGG	YEQY	9	2/29	
7-2.1	CASS LGRGS	YAEQF	10	2/29	

familles V β affichant une distribution biaisée des tailles de la région CDR3 ont été détectées dans différentes souris (comme V β 10 et V β 11), aucune famille V β n'a été invariablement identifiée parmi toutes les souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatiques. De plus, il est important de noter que les séquences peptidiques du CDR3 surreprésentées sont différentes d'une souris à l'autre et aucune séquence consensus ne semble se dégager. L'ensemble de ces données indique que la distribution biaisée des tailles CDR3 des chaînes variables β du TCR des cellules T CD8⁺ isolées du SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatiques légères représente une population oligoclonale.

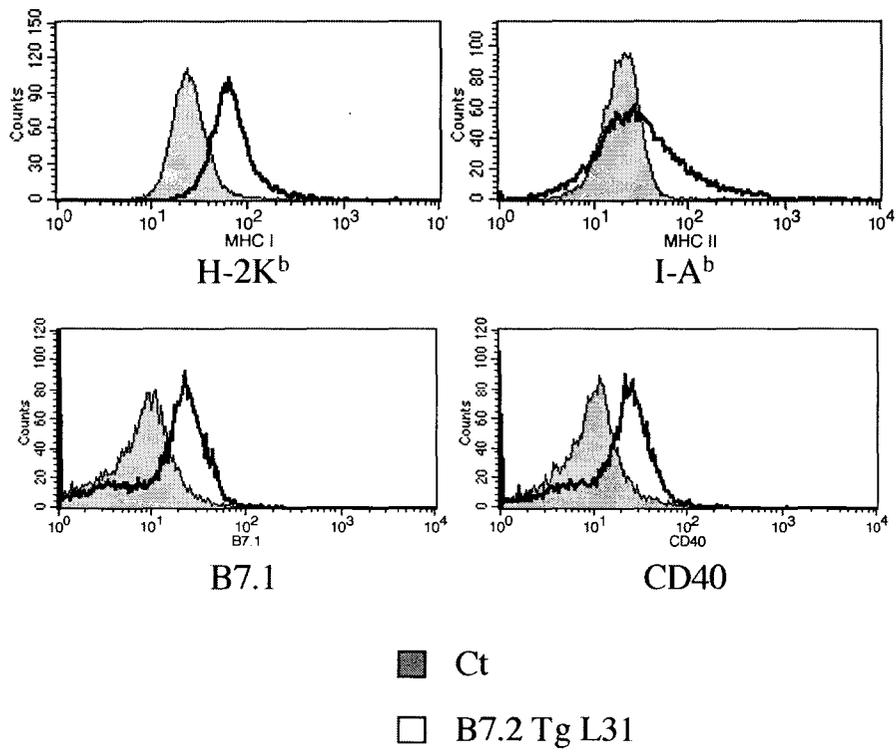
4.0.4 L'état d'activation de la microglie corrèle avec l'induction de la pathologie chez les souris B7.2 Tg L31

Les cellules de la microglie s'activent rapidement dans la plupart des situations inflammatoires et dégénératives affectant le SNC (Gehrmann J. 1996, Kreutzberg G. W. 1996) et cette activation des cellules de la microglie est notamment très importante pour l'initiation de l'EAE (Heppner F. L. et al. 2005). Les cellules de la microglie activées possèdent les caractéristiques phénotypiques de CPA professionnelles, notamment l'augmentation de l'expression des molécules des CMH de classe I et II, l'augmentation de l'expression du corécepteur CD40 et l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation B7.1 et B7.2 (Carson M. J. 2002, Guillemin G. J. et al. 2004, Olson J. K. et al. 2001). Nous avons vérifié l'état d'activation des cellules de la microglie chez les souris B7.2 Tg L31. L'expression des molécules des CMH I et II, l'expression du récepteur CD40 et l'expression de la molécule B7.1 sont significativement augmentées sur les cellules de la microglie (cellules CD45^{faible} CD11b⁺) isolées des souris B7.2 Tg

Fig. 20 Activation des cellules de la microglie dans le SNC de souris B7.2 Tg L31 symptomatiques.

Analyse en cytométrie de flux du niveau d'expression des molécules de CMH classe I H-2K^b, de CMH classe II I-A^b, de B7.1 et de CD40 sur les cellules de la microglie (CD11b⁺ CD45^{faible}) isolées du SNC d'une souris C57BL/6 (histogramme plein) et d'une souris B7.2 Tg L31 symptomatique (histogramme vide). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Figure 20



L31 symptomatiques (Fig. 20). Ces résultats indiquent que les cellules de la microglie retrouvées dans le SNC des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques sont activées. Il est intéressant de noter que l'expression des molécules du CMH de classe I est augmentée davantage que celle des molécules du CMH de classe II sur les cellules de la microglie des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques. Pour déterminer si l'activation des cellules de la microglie était la conséquence de l'influx massif de cellules T dans le SNC des animaux symptomatiques, nous avons vérifié le niveau d'expression des mêmes marqueurs phénotypiques sur des cellules de la microglie isolées de jeunes souris B7.2 Tg L31 (âgées de 3 semaines) qui présentent une faible fréquence de cellules T dans le SNC et aucun symptôme. Nous avons détecté sur les cellules de la microglie de ces jeunes souris B7.2 Tg L31 précliniques un niveau d'expression des molécules du CMH de classe I similaire à celui observé sur les cellules de la microglie des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques (Fig. 21A) et ce malgré une faible fréquence de cellules T dans le SNC. Les niveaux d'expression des molécules B7.1 et CD40 sont aussi légèrement augmentés sur les cellules de la microglie des souris B7.2 Tg L31 âgées de 4 semaines comparativement aux souris C57BL/6 du même âge (Fig. 21A). Ces résultats démontrent que l'activation des cellules de la microglie précède les manifestations cliniques chez les souris B7.2 Tg L31 et l'influx massif de cellules T CD8⁺ dans le SNC.

Il a été démontré *in vitro* que des cellules T activées peuvent stimuler les cellules de la microglie de façon non spécifique en absence d'antigène (Dasgupta S. et al. 2002, Dasgupta S. et al. 2003). Pour déterminer si l'augmentation d'expression des molécules du CMH, de B7.1 et de CD40 était attribuable à la plus grande fréquence de cellules T mémoires dans le SNC des souris B7.2 Tg L31, nous avons analysé l'expression des

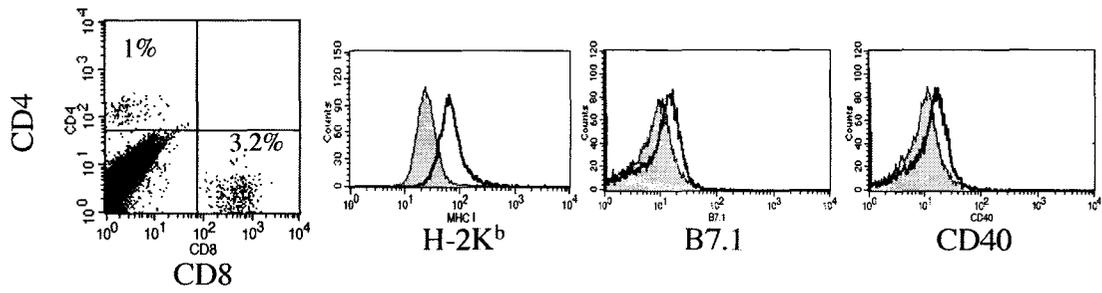
Fig. 21 L'activation des cellules de la microglie dans le SNC de souris B7.2 Tg L31 précède l'infiltration par les cellules T CD8⁺.

Analyse en cytométrie de flux de la fréquence de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ isolées du SNC de souris B7.2 Tg L31 âgées de 4 semaines (A) et de souris B7.2 Tg L27 âgées de 3 mois (B). Analyse en cytométrie de flux du niveau d'expression des molécules de CMH classe I H-2K^b, de B7.1 et de CD40 sur les cellules de la microglie (CD11b⁺ CD45^{low}) isolées du SNC d'une souris C57BL/6 (Ct) (histogramme plein) et d'une souris B7.2 Tg L31 âgées de 4 semaines (histogramme vide). Analyse en cytométrie de flux du niveau d'expression des molécules de CMH classe I H-2K^b sur les cellules de la microglie (CD11b⁺ CD45^{low}) isolées du SNC d'une souris C57BL/6 (Ct) (histogramme plein) et d'une souris B7.2 Tg L27 âgées de 3 mois (histogramme vide). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Figure 21

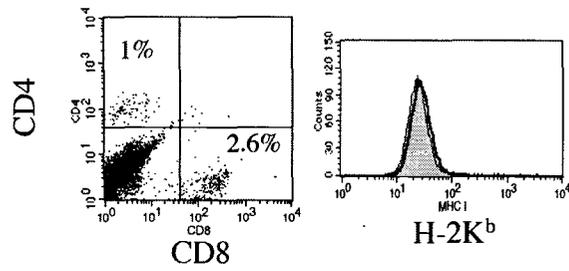
A

B7.2 Tg L31 (4 sem.)



B

B7.2 Tg L27 (3 mois)



■ Ct
□ B7.2 Tg

molécules du CMH classe I sur les cellules de la microglie de souris B7.2 Tg L27 qui ne développent pas de symptômes mais qui présentent une proportion de lymphocytes T mémoires dans le SNC supérieure à celle trouvée dans les souris C57BL/6 (Zehntner S. P. et al. 2003). L'expression du CMH classe I sur les cellules de la microglie n'est pas augmentée dans les souris B7.2 Tg L27 comparée au souris C57BL/6 malgré une fréquence de cellules T dans le SNC similaire à celle observée chez les jeunes souris B7.2 Tg L31 (Fig. 21B). Ces résultats suggèrent qu'une fréquence augmentée de cellules T mémoires/effectrices dans le SNC n'est pas suffisante pour induire une augmentation de l'expression des molécules du CMH classe I chez les cellules de la microglie et que l'expression constitutive de la molécule B7.2 sur la microglie est requise.

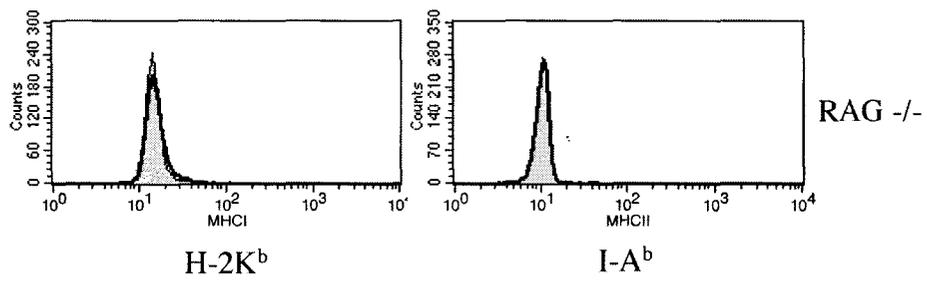
Le niveau d'expression des molécules du CMH I n'est pas augmenté sur les cellules de la microglie isolées des souris RAG $-/-$ B7.2 Tg L31 déficientes en lymphocytes comparativement aux souris contrôles (Fig. 22A). Ces résultats démontrent que même si l'expression de la molécule B7.2 chez les souris Tg L31 est sous le contrôle du promoteur H-2K^b, l'expression du transgène par les cellules de la microglie n'affecte pas *per se* leur état d'activation et que les cellules T participent à l'activation des cellules de la microglie chez les souris B7.2 Tg L31. Nous avons également observé que le niveau d'expression des molécules du CMH I n'est pas augmenté sur les cellules de la microglie isolées de souris OT-1 TCR Tg B7.2 Tg comparativement aux souris contrôles (Fig. 22B). Ces résultats suggèrent qu'en plus de la présence combinée de cellules T et de l'expression de la molécule B7.2 dans le SNC, l'activation des cellules de la microglie nécessite une reconnaissance antigénique de la part des lymphocytes T directement dans le SNC. Nos observations démontrent que l'activation des cellules de la microglie ne

Fig. 22 L'activation des cellules de la microglie corrèle avec les manifestations cliniques dans le SNC.

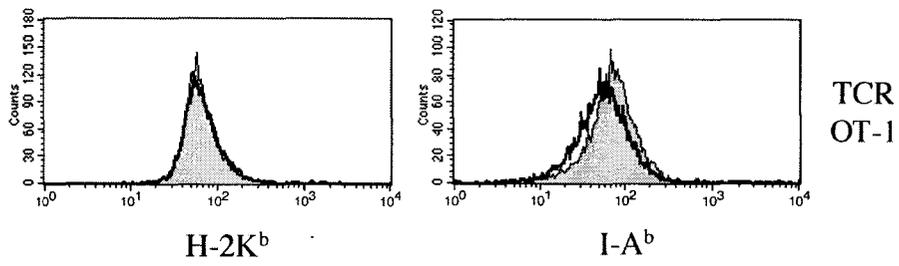
Analyse en cytométrie de flux du niveau d'expression des molécules de CMH classe I H-2K^b et de CMH classe II I-A^b sur les cellules de la microglie (CD11b⁺ CD45^{faible}) isolées du SNC d'une souris C57BL/6 RAG -/- (Ct) (histogramme plein) et d'une souris RAG -/- B7.2 Tg L31 (L31) (histogramme vide) (A). Analyse en cytométrie de flux du niveau d'expression des molécules de CMH classe I H-2K^b et de CMH classe II I-A^b sur les cellules de la microglie (CD11b⁺ CD45^{faible}) isolées du SNC d'une souris C57BL/6 OT-1 Tg (Ct) (histogramme plein) et d'une souris OT-1 Tg B7.2 Tg L31 (L31) (histogramme vide) (B).

Figure 22

A



B



■ Ct
□ B7.2 Tg L31

survient que dans les souris qui développent la pathologie et suggèrent que l'activation des cellules de la microglie est une étape qui survient tôt lors de la pathogenèse. Nous n'avons jamais observé d'augmentation des molécules du CMH de classe I ou de classe II dans différentes populations cellulaires (cellules B, macrophages et cellules dendritiques) présentes à la rate et aux ganglions lymphatiques de souris B7.2 Tg L31 précliniques ou symptomatiques (résultat non montré), appuyant ainsi le fait que l'activation des CPAs se manifeste spécifiquement dans l'organe cible, soit le SNC.

4.0.5 La signalisation par le récepteur de l'IFN γ est requise pour l'induction de la pathologie chez les souris B7.2 Tg L31

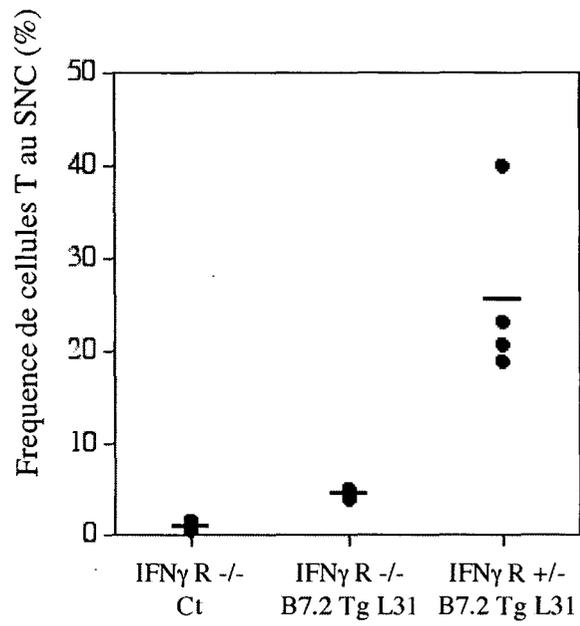
L'IFN γ est une puissante cytokine pro-inflammatoire capable d'activer et d'augmenter l'expression des molécules du CMH de plusieurs types de cellules présentatrices d'antigènes, incluant les cellules de la microglie (Aloisi F. 2001). Nous avons démontré qu'une fréquence élevée de cellules T CD8⁺ produisent de l'IFN γ dans le SNC de souris B7.2 Tg L31 précliniques et symptomatiques (Fig. 10B). Pour déterminer si l'IFN γ joue un rôle dans la pathologie démyélinisante affectant les souris B7.2 Tg L31, nous avons étudié le développement de la pathologie chez des souris B7.2 Tg L31 où l'expression du récepteur à l'interféron- γ (IFN γ R) est déficiente (souris IFN γ R -/- B7.2 Tg L31). Aucune des souris IFN γ R -/- B7.2 Tg L31 (n=12) n'a développé de symptômes neurologiques sur une période de 8 mois. Les analyses en cytométrie de flux effectuées sur les cellules mononuclées isolées du SNC révèlent que la fréquence de cellules T infiltrantes est significativement réduite dans les souris IFN γ R -/- B7.2 Tg L31 (n=5) lorsque comparée aux souris IFN γ R +/- B7.2 Tg L31 (n=4) (Fig. 23A et 23B). La faible

Fig. 23 Fréquence réduite de lymphocytes T infiltrant le SNC de souris IFN γ R -/- B7.2 Tg L31.

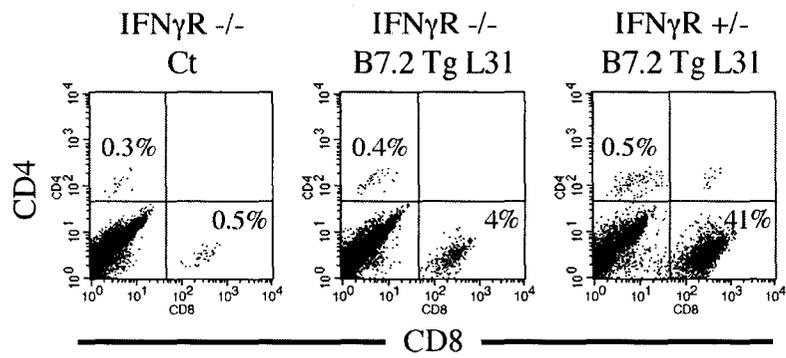
Fréquence de cellules T parmi les cellules mononuclées isolées du SNC des souris IFN γ R -/- Ct (n = 5), IFN γ R -/- B7.2 Tg L31 (n = 5) et IFN γ R +/- B7.2 Tg L31 (n = 4) âgées de 5 mois (A). Analyse en cytométrie de flux de la fréquence de cellules T CD4⁺ et CD8⁺ isolées à partir du SNC de souris IFN γ R -/- Ct, IFN γ R -/- B7.2 Tg L31 et IFN γ R +/- B7.2 Tg L31 âgées de 5 mois (B).

Figure 23

A



B



population de cellules T infiltrantes trouvées dans le SNC des souris IFN γ R^{-/-} B7.2 Tg L31 reste dominée par les lymphocytes T CD8⁺ (Fig. 23B). Il a été suggéré que les cellules mémoires/effectrices ont une capacité accrue pour traverser la barrière hémato-encéphalique (Hickey W. F. 2001). Pour vérifier que la fréquence réduite de lymphocytes T CD8⁺ dans le SNC des souris IFN γ R^{-/-} B7.2 Tg L31 n'était pas une conséquence d'une diminution de la fréquence de cellules T CD8⁺ mémoires/effectrices en périphérie, nous avons marqué les cellules T CD8⁺ isolées de la rate et celles qui sont isolées du SNC des souris IFN γ R^{-/-} B7.2 Tg L31 et IFN γ R^{+/-} B7.2 Tg L31 avec un anticorps dirigé contre le marqueur d'activation CD44. En absence de signalisation par l'IFN γ R, les souris IFN γ R^{-/-} B7.2 Tg L31 présentent dans la rate une fréquence de cellules T CD8⁺ CD44^{élevé} aussi élevée que celle trouvée dans la rate des souris IFN γ R^{+/-} B7.2 Tg L31 (Fig. 24). D'autres marqueurs d'activation des cellules T ont été analysés (CD69 et CD62L) et aucune différence dans l'expression de ces différents marqueurs par les cellules T CD8⁺ périphériques n'a été observée entre les souris IFN γ R^{-/-} B7.2 Tg L31 et les souris IFN γ R^{+/-} B7.2 Tg L31 (résultat non montré). Ces résultats indiquent que la fréquence réduite de lymphocyte T CD8⁺ dans le SNC des souris IFN γ R^{-/-} B7.2 Tg L31 n'est pas due à une fréquence réduite de cellules T mémoires/effectrices en périphérie.

4.0.6 L'activation des cellules de la microglie est dépendante de la signalisation de l'IFN γ chez les souris B7.2 Tg L31

Nous avons déterminé par cytométrie de flux le niveau d'expression des molécules du CMH de classe I et de classe II sur les cellules de la microglie des souris IFN γ R^{-/-} B7.2 Tg L31 pour évaluer le rôle de l'IFN γ dans le mécanisme d'activation des

Fig. 24 Fréquence de cellules T CD8⁺ CD44^{élevé} dans la rate et dans le SNC des souris IFN γ R -/- B7.2 Tg L31.

Analyse en cytométrie de flux de la fréquence de cellules exprimant les molécules CD8 et CD44 parmi les cellules isolées de la rate et du SNC de souris IFN γ R -/- Ct, IFN γ R -/- B7.2 Tg L31 et IFN γ R +/- B7.2 Tg L31 âgées de 5 mois. Ces résultats sont représentatifs de trois expériences indépendantes.

Figure 24

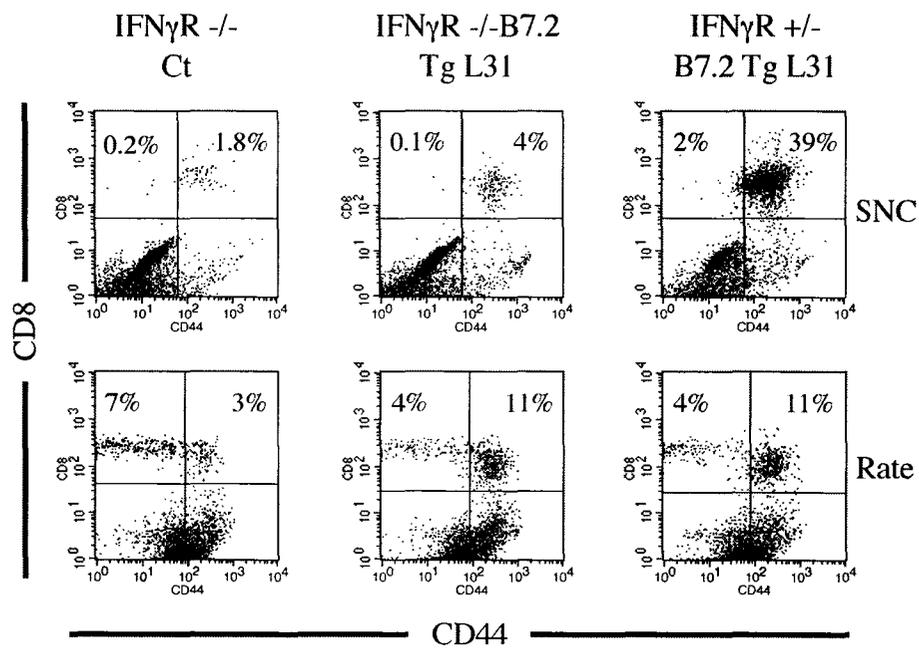
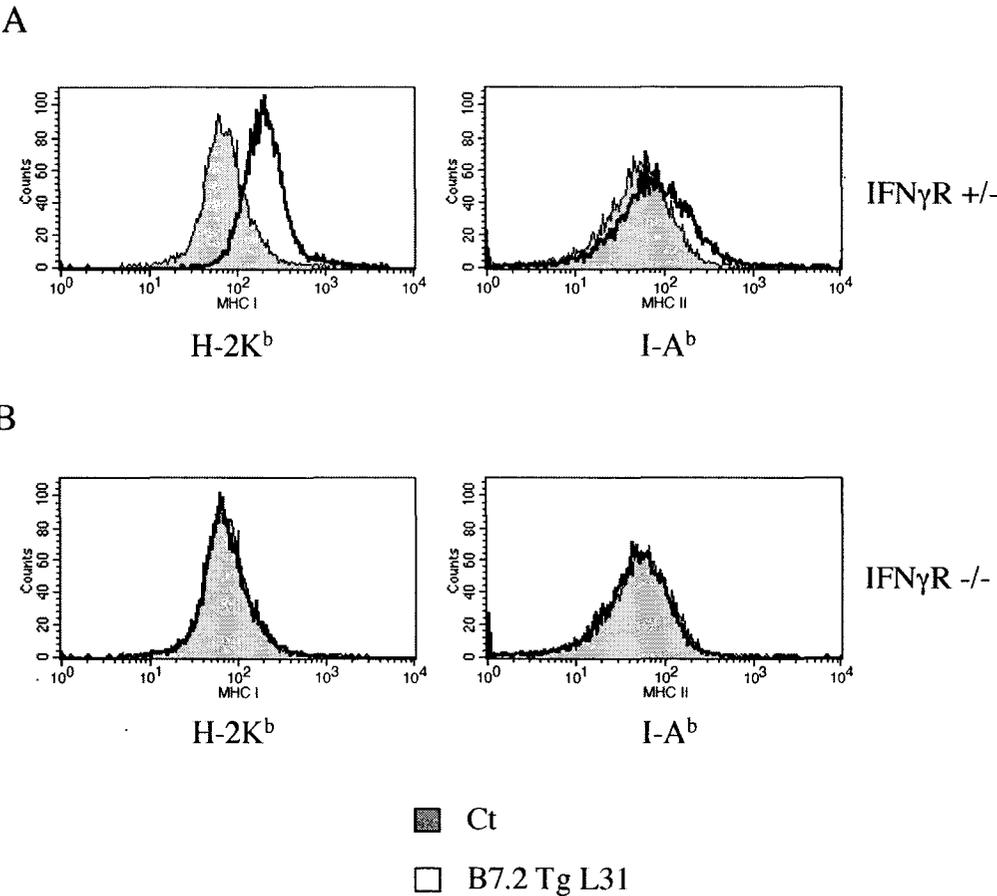


Fig. 25 L'activation des cellules de la microglie chez les souris B7.2 Tg L31 requiert la signalisation via le récepteur de l'IFN γ .

Analyse en cytométrie de flux du niveau d'expression des molécules de CMH classe I H-2K^b et de CMH classe II I-A^b sur les cellules de la microglie (CD11b⁺ CD45^{faible}) isolées du SNC d'une souris C57BL/6 IFN γ R +/- (Ct) (histogramme plein) et d'une souris IFN γ R +/- B7.2 Tg L31 (L31) (histogramme vide) (A). Analyse en cytométrie de flux du niveau d'expression des molécules de CMH classe I H-2K^b et de CMH classe II I-A^b sur les cellules de la microglie (CD11b⁺ CD45^{faible}) isolées du SNC d'une souris C57BL/6 IFN γ R -/- (Ct) (histogramme plein) et d'une souris IFN γ R -/- B7.2 Tg L31 (L31) (histogramme vide) (B). Ces résultats sont représentatifs de 3 expériences indépendantes.

Figure 25



cellules de la microglie des souris B7.2 Tg L31. Aucune différence au niveau de l'expression des CMH I et II sur les cellules de la microglie (cellules CD45^{faible} CD11b⁺) n'a été notée entre les souris IFN γ R -/- B7.2 Tg L31 et les souris IFN γ R -/- C57BL/6 (Fig. 25B). Par contre, les cellules de la microglie des souris IFN γ R +/- B7.2 Tg L31 présentent des niveaux d'expression des CMH I et II supérieurs à ceux observés chez les souris IFN γ R +/- C57BL/6 (Fig. 25A), notamment pour le CMH I. Ces résultats indiquent clairement que la signalisation de l'IFN γ est requise pour l'activation des cellules de la microglie chez les B7.2 Tg L31 et constitue une étape cruciale de la pathogenèse.



5.0 Discussion

Avec ces travaux, nous avons démontré que des souris exprimant de façon constitutive la molécule de costimulation B7.2 sur les cellules de la microglie dans le SNC développent spontanément des lésions de démyélinisation dans le parenchyme de la moelle épinière ainsi que dans les ganglions spinaux. Nous avons démontré que ce processus de démyélinisation affectant les souris B7.2 Tg L31 est issu d'une pathogenèse autoimmune qui est déclenchée par l'expression constitutive de B7.2 par les cellules de microglie et qui requiert la participation des lymphocytes T comme cellules effectrices. Nous avons également déterminé les rôles respectifs joués par les différentes sous-populations lymphocytaires au niveau de la pathogenèse. Les cellules T CD8⁺ constituent la sous-population lymphocytaire nécessaire au développement des symptômes cliniques alors que les cellules T CD4⁺ jouent un rôle immunorégulateur. La comparaison du répertoire de lymphocytes T CD8⁺ retrouvé aux ganglions lymphatiques périphériques avec celui retrouvé dans le SNC des souris symptomatique suggère que des cellules T CD8⁺ autoréactives sont activées directement au sein du SNC. De plus, l'analyse du répertoire des lymphocytes T CD8⁺ dans le SNC de souris symptomatiques a révélé que les prévalences clonales n'étaient pas partagées mais plutôt propres à chaque souris. Finalement, nos résultats suggèrent que l'activation des cellules de la microglie survient tôt dans la pathogenèse menant à la démyélinisation et nous avons démontré que la signalisation par le récepteur de l'IFN γ était absolument requise pour l'activation des cellules de la microglie. L'ensemble de ces observations représentent une première démonstration où l'expression constitutive d'une molécule de costimulation par des

cellules présentatrices d'antigènes résidentes au système nerveux contribue au développement d'une démyélinisation autoimmune spontanée spécifique au SNC.

5.0.1 Expression constitutive de la molécule B7.2 sur les cellules de la microglie des souris B7.2 Tg L31

Il est très intéressant d'observer l'expression constitutive du transgène B7.2 chez les cellules de la microglie car ni le promoteur (H-2K^b) ni la séquence régulatrice (I μ) ne pouvait prédire un tel tropisme d'expression. Il est important de mentionner que ni les macrophages résidents du SNC (cellules CD45^{élevé} CD11b⁺) (Fig. 13), ni les macrophages présents dans la rate des souris TCR β -/- B7.2 Tg L31 (résultat non montré) n'expriment constitutivement B7.2, ce qui indique que le transgène B7.2 n'est pas globalement exprimé par l'ensemble des cellules myéloïdes. Ce type d'expression transgénique où le transgène n'est pas exprimé par l'ensemble des cellules d'une même population a déjà été montré dans un modèle d'expression transgénique de la molécule B7.1 sur les cellules β du pancréas (Allison J. et al. 1998). Dans ce modèle, deux lignées de souris transgéniques indépendantes présentaient deux patrons d'expression différents de la molécule B7.1 sur les cellules β du pancréas, soit une expression du transgène sur toutes les cellules β du pancréas ou une expression du transgène restreinte à certaines cellules β du pancréas. La cause d'un tel phénotype d'expression reste néanmoins inconnue. L'expression constitutive de la molécule B7.2 par les cellules de la microglie ne semble pas être la conséquence du site d'intégration du transgène dans la lignée 31 car nous avons également observé le développement des mêmes symptômes neurologiques chez

les souris B7.2 Tg L7 qui expriment également la molécule B7.2 de façon constitutive sur les cellules de la microglie, mais à des niveaux inférieurs de ceux qui sont observés chez les souris B7.2 Tg L31 (résultat non montré). Nos données préliminaires indiquent une incidence réduite chez les souris B7.2 Tg L7 (moins de 5% après 6 mois) en comparaison aux souris B7.2 Tg L31, ce qui corrèle avec le faible niveau d'expression de la molécule B7.2 sur les cellules de la microglie chez la lignée 7. Le fait que l'expression de la molécule B7.2 par les cellules de microglie observée chez les souris B7.2 Tg L31 n'a été affectée ni par la re-dérivation de la lignée par transfert embryogénique ni par le maintien de la lignée dans quatre différentes animaleries exemptes de pathogènes spécifiques suggère que l'origine de la pathologie n'est pas virale mais autoimmune.

L'expression de la molécule B7.2 a également été détectée par immunohistochimie au système nerveux périphérique (SNP) proximal des souris B7.2 Tg L31 sur des cellules ayant une morphologie plutôt arrondie et amoéboïde (Fig. 12A). Les données recueillies suggèrent que la pathologie n'affecte pas le système nerveux périphérique distal. En effet, les lésions de démyélinisation (Fig. 5D) associées à des infiltrats cellulaires (Fig. 2B) sont restreintes au niveau des ganglions spinaux et aucune infiltration n'est détectée aux nerfs sciatiques distaux. En raison de la position anatomique et de la taille des ganglions spinaux, il a été techniquement impossible de caractériser l'infiltrat cellulaire présent et d'identifier les cellules B7.2⁺ qui résident dans le SNP. L'ensemble des résultats immunohistochimiques suggèrent que les événements pathogéniques survenant dans le SNP et dans le SNC sont analogues. Parce que toutes les souris B7.2 Tg L31 analysées présentent des lésions de démyélinisation dans le SNC et dans le SNP, nous n'avons pas été en mesure de déterminer clairement si les lésions de

démyélinisation se développent dans une des parties du système nerveux puis progressent vers l'autre ou si ces lésions se développent dans le système nerveux central et périphérique de façon synchronisée. L'implication du SNP et SNC dans une pathologie démyélinisante n'est pas unique à notre modèle. En effet, la démyélinisation du SNP proximal chez des patients atteints de sclérose en plaques a été observée à plusieurs reprises (Di Trapani G. et al. 1996, Quan D. et al. 2005). De plus, des lésions de démyélinisation et des infiltrats cellulaires sont retrouvés au niveau des ganglions spinaux dans un modèle EAE de souris transgénique pour la molécule de classe II humaine HLA-DR15 et pour un TCR spécifique au peptide MBP₈₅₋₉₉ associé avec HLA-DR15 (Ellmerich S. et al. 2005). Parce que l'expression de l'épitope MBP₈₅₋₉₉ est restreinte au SNC, il a été déterminé que la pathologie est initiée dans le SNC puis progresse ensuite jusqu'à inclure le processus de démyélinisation dans le SNP (Ellmerich S. et al. 2005).

Des molécules de costimulation ont déjà été exprimées de façon transgénique dans un organe périphérique dans le dessein de briser la tolérance des lymphocytes T autoréactifs. L'expression de la molécule B7.1 au niveau d'un organe comme le pancréas a déjà été réalisée dans différents modèles animaux de diabète de type I, une pathologie avec une étiologie autoimmune présumée et dont la pathogenèse repose sur l'activation de cellules T autoréactives (Adorini L. et al. 2002). Ces études ont démontré que l'expression transgénique de la molécule B7.1 sur les cellules β du pancréas sous le contrôle du promoteur à l'insuline du rat (RIP) ne brisait pas la tolérance des lymphocytes T autoréactifs chez les animaux génétiquement résistants au diabète (Allison J. et al. 1998, Guerder S. et al. 1994, Harlan D. M. et al. 1994). En plus de l'expression

de RIP-B7.1, un deuxième transgène codant pour une cytokine pro-inflammatoire comme le TNF α (Guerder S. et al. 1994) ou l'IL-2 (Allison J. et al. 1998) doit être exprimé localement pour briser la tolérance immunologique dans ces modèles dont le fond génétique est C57BL/6. Il a cependant été démontré que l'expression de RIP-B7.1 au pancréas de souris dont le fond génétique non-obèse et diabétique (NOD) est susceptible au diabète, était suffisante et accélérât la pathogenèse (Allison J. et al. 1998, Wong S. et al. 1995). Les souris B7.2 Tg L31 sont sur le fond génétique C57BL/6, un fond génétique qui n'a jamais été rapporté comme étant particulièrement susceptible à l'autoimmunité affectant le SNC. Contrairement aux souris C57BL/6 RIP-B7.1 Tg, les souris C57BL/6 B7.2 Tg L31 ne nécessitent pas l'expression d'un second gène pro-inflammatoire pour initier la pathogenèse autoimmune. Les cellules β du pancréas n'ont pas les mêmes capacités de présentation antigénique qu'une CPA professionnelle, notamment à cause des niveaux d'expression des molécules CMH I et II. Constitutivement, les cellules β du pancréas expriment les molécules CMH I à des niveaux nettement inférieurs à ceux exprimés par des CPAs comme les macrophages et n'expriment pas de molécules CMH II (Leiter E. H. et al. 1989). Chez la souris NOD, les cellules β du pancréas augmentent leur expression des molécules CMH I avec l'âge ou lorsqu'elles sont stimulées par la cytokine pro-inflammatoire IFN γ (Thomas H. E. et al. 1998). Cependant, cette augmentation de l'expression des molécules CMH I par les cellules β du pancréas est dissociée du développement du diabète (Thomas H. E. et al. 1998). La différence du niveau de présentation d'autoantigènes par les molécules CMH I pourrait expliquer pourquoi l'expression transgénique de la molécule B7.2 par une CPA professionnelle comme la cellule de la microglie contribue à l'activation des lymphocytes

T CD8⁺ autoréactifs dans le cas des souris B7.2 Tg L31 et non chez les souris RIP-B7.1 Tg.

5.0.2 L'expression de ligand de costimulation par les CPAs tissulaires conduit à une réponse autoimmune spécifique à l'organe

Le fait que les souris TCR β ^{-/-} B7.2 Tg L31 soient résistantes à la pathologie démontre clairement que les lymphocytes T, et non pas les cellules NK ou les lymphocytes T $\gamma\delta$, jouent un rôle important dans la pathogenèse menant à la démyélinisation. Les lymphocytes B ne semblent pas être impliqués dans le développement de cette pathologie car leur fréquence dans le SNC des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques est similaire à celle observée chez une souris C57BL/6. Même si les cellules T sont requises pour l'initiation des symptômes neurologiques, elles ne sont pas suffisantes. En effet, nos travaux démontrent qu'au moins deux conditions doivent être remplies ou rencontrées pour observer le développement spontané de lésions de démyélinisation: la présence de la molécule de costimulation B7.2 dans le SNC et l'accès des cellules T au SNC. Le rôle joué par l'expression de la molécule B7.2 sur la microglie a été directement démontré par les expériences de transfert adoptif. Lorsque l'on transfère des lymphocytes T d'une souris B7.2 Tg L31 à une souris TCR β ^{-/-} B7.2 Tg L31 ou à une souris TCR β ^{-/-} C57BL/6, seules les souris TCR β ^{-/-} B7.2 Tg L31 présentent une accumulation significative de cellules T dans le SNC et des manifestations cliniques. Parce que les souris receveuses ont toutes reçu les mêmes lymphocytes T B7.2 Tg, ces résultats suggèrent que c'est l'expression de la molécule B7.2 au système nerveux qui détermine le développement de symptômes neurologiques dans ce modèle murin de

démyélinisation spontanée. L'expression de la molécule B7.2 par les cellules de la microglie est importante pour l'initiation de la démyélinisation chez les souris B7.2 Tg L31, ce qui suggère que la stimulation des cellules T autoréactives prends place dans le SNC de souris B7.2 Tg L31. Nos résultats corroborent les résultats obtenus lors de différentes études et qui suggèrent que les cellules T autoréactives encéphalitogéniques doivent être stimulées localement dans le SNC par les CPAs résidentes pour initier la pathologie dans différents modèles de démyélinisation (Heppner F. L. et al. 2005, Kawakami N. et al. 2004, McMahon E. J. et al. 2005, Muhallab S. et al. 2001, Tompkins S. M. et al. 2002). Il a été démontré que les cellules T autoréactives acquièrent leurs fonctions effectrices dans le SNC puisque les cellules T autoréactives spécifiques trouvées dans le SNC produisent significativement plus d'IFN γ et prolifèrent davantage que les cellules T spécifiques périphériques dans un modèle EAE (Muhallab S. et al. 2001). Des transferts adoptifs de cellules T encéphalitogéniques ont également démontré que les cellules T encéphalitogéniques sont réactivées dans le SNC (Flugel A. et al. 2001, Kawakami N. et al. 2004). De plus, l'activation de cellules T naïves spécifiques pour des épitopes issus de la dégénérescence épitopique survient directement dans le SNC et non dans les ganglions lymphatiques cervicaux ou périphériques dans deux modèles de démyélinisation induits (McMahon E. J. et al. 2005). Même si ces observations démontrent une activation ou une réactivation nécessaire des cellules T autoréactives directement dans le SNC, elles ne permettent pas d'identifier clairement la population responsable de cette stimulation. La démonstration d'une participation des CPAs résidentes du SNC lors de la stimulation des cellules T autoréactives dans le SNC a été réalisée notamment dans deux modèles EAE dans lesquels les CPAs résidentes du SNC

n'expriment pas le récepteur CD40 (Becher B. et al. 2001) ou la cytokine IL-23 (Becher B. et al. 2003). Le fait que les cellules de la microglie exprimant la molécule B7.2 sont capables de stimuler des cellules T autoréactives pour amorcer un processus de démyélinisation spontanée chez la souris B7.2 Tg suggère que les cellules de la microglie peuvent jouer un rôle prédominant dans la stimulation des cellules T autoréactives dans le SNC, mais n'exclue pas la participation d'autres CPAs résidentes au SNC comme les cellules dendritiques, les macrophages périvasculaires ou encore les astrocytes. En paralysant spécifiquement les cellules de la microglie, une étude récente a également révélé l'importance des fonctions des cellules de la microglie lors de l'induction de l'EAE (Heppner F. L. et al. 2005). D'autre part, deux groupes indépendants ont plutôt identifié les cellules dendritiques comme principale population cellulaire responsable de la présentation antigénique aux cellules T autoréactives au SNC dans le modèle EAE (Greter M. et al. 2005, McMahon E. J. et al. 2005). Il est probable que la nature de la cellule présentatrice d'antigène essentielle pour le développement d'une pathologie démyélinisante au SNC soit différente d'un modèle animal à l'autre mais révèle quand même l'important rôle d'un tel type cellulaire dans le contrôle de l'autoimmunité affectant le SNC.

Les expériences de transfert adoptif ont également démontré que l'expression de la molécule B7.2 par les cellules de la microglie était importante mais pas suffisante pour le développement de la pathologie. En effet, il s'avère que l'expression du transgène par les cellules T est également importante pour le développement des symptômes chez les souris receveuses car le transfert de cellules T isolées de souris C57BL/6 n'induit pas d'accumulation de cellules T dans le SNC ou de symptômes chez les souris receveuses

qui expriment pourtant de façon constitutive la molécule B7.2 dans le SNC. Nous savons que l'expression du transgène B7.2 à la surface des cellules T des souris B7.2 Tg L31 résulte en une augmentation de la fréquence de cellules T mémoires dans les organes lymphoïdes périphériques comparativement aux souris C57BL/6 (Fournier S. et al. 1997, Yu X. et al. 2000). Cette caractéristique des souris B7.2 Tg L31 contribue potentiellement à l'accroissement du trafic lymphocytaire dans le SNC car il a été rapporté que les cellules T mémoires ont une capacité accrue à traverser la barrière hémato-encéphalique (Hickey W. F. 2001). Pour vérifier l'hypothèse selon laquelle l'accès des cellules T au SNC est important pour le développement spontané de lésions de démyélinisation et que le phénotype mémoire contribue à faciliter cet accès, il serait intéressant de transférer des cellules T mémoires purifiées à partir de souris C57BL/6 ou des cellules T isolées de souris C57BL/6 qui ont été différenciées en cellules mémoires suite à une stimulation polyclonale *in vitro* avec des anticorps immobilisés anti-CD3 et anti-CD28. Suite au transfert de ces cellules T mémoires à des souris receveuses qui expriment de façon constitutive la molécule B7.2, si une accumulation de cellules T et des symptômes neurologiques ne sont pas observés chez les souris receveuses, il faudra alors envisager une hypothèse selon laquelle l'expression de la molécule B7.2 par les cellules T contribue à leur capacité encéphalitogénique d'une autre façon qu'en affectant la fréquence de cellules T mémoires périphériques et leur accès au SNC.

Les souris B7.2 Tg L27 montrent aussi une hausse de la fréquence de cellules T mémoires périphériques similaire à celle observée chez les souris B7.2 Tg L31 (Fournier S. et al. 1997) et qui se traduit également par un accroissement du trafic de lymphocytes T dans le SNC lorsque comparé aux souris C57BL/6 (Fig. 7B). Pourtant, les souris B7.2

Tg L27 ne développent pas de symptômes neurologiques malgré l'augmentation de la fréquence de lymphocytes T trouvés dans le SNC, ce qui suggère que la simple augmentation du trafic dans le SNC n'est pas suffisante pour initier une réponse immunitaire autoimmune à l'organe cible en absence de signaux de costimulation adéquats dans le SNC. Le fait qu'aucune infiltration significative de cellules T n'a été observée dans d'autres tissus que le SNC supporte également l'importance de l'expression de B7.2 dans le SNC pour la spécificité tissulaire de la pathologie.

5.0.3 Les cellules de la microglie des souris B7.2 Tg L31 sont capables de stimuler des cellules T autoréactives *in vivo*

Connaître le potentiel de présentation antigénique endogène des cellules de la microglie aux lymphocytes T est fondamental pour la compréhension des mécanismes sous-jacents à l'initiation d'une réponse immunologique spécifique dans le SNC des patients atteints de sclérose en plaques. Il a été démontré que les cellules de la microglie naïves (i.e. non activées par l'exposition à des conditions inflammatoires) isolées à partir de SNC de souris C57BL/6 sont incapables de stimuler la prolifération de cellules T CD4⁺ dans un essai de prolifération avec différents peptides dérivés de la protéine PLP (Katz-Levy Y. et al. 1999, Mack C. L. et al. 2003). En effet, seules les cellules de la microglie isolées à partir du SNC de souris infectées par le virus de Theiler de façon chronique peuvent présenter de façon efficace les différents peptides à des lignées de cellules T CD4⁺ spécifiques. Ces résultats suggèrent que seules les cellules de la microglie activées qui augmentent leurs capacités costimulatoires et l'expression du CMH II sont de véritables CPAs dans le modèle du virus de Theiler. Nos travaux

suggèrent que les cellules de la microglie, lorsqu'elles expriment la molécule B7.2, sont des CPAs qui présentent efficacement *in vivo* des peptides endogènes via les molécules CMH I et qui stimulent la différenciation des cellules T CD8⁺ autoréactives en cellules effectrices qui créeront ultérieurement un environnement inflammatoire. Dans notre modèle, il apparaît donc que les conditions inflammatoires sont des conséquences et non des causes de la présentation efficace de peptides endogènes par les cellules de la microglie aux cellules T autoréactives et que le niveau de costimulation présenté par les cellules de la microglie détermine la portée de la réponse des cellules T autoréactives. La présentation de peptides endogènes aux cellules T CD8⁺ via le CMH I est nettement plus probable que la présentation de peptides exogènes aux cellules CD4⁺ via le CMH II dans un SNC naïf. En effet, les molécules de CMH I sont constitutivement exprimées par les cellules de la microglie à l'inverse des molécules du CMH II qui ne sont significativement exprimées qu'après activation (Ponomarev E. D. et al. 2005, Sedgwick J. D. et al. 1991). Ce potentiel de présentation de peptides endogènes par les cellules de la microglie aux cellules CD8⁺ autoréactives ouvre de nouvelles perspectives relativement à l'induction de l'autoimmunité affectant le système nerveux.

5.0.4 Les cellules T CD8⁺ sont les cellules effectrices centrales du processus de démyélinisation spontanée observé

Avec ce modèle animal, nous avons également démontré que les cellules T CD8⁺ pouvaient jouer un rôle primordial durant une réponse autoimmune affectant le SNC. En effet, l'accumulation progressive de cellules T CD8⁺ dans le tissu nerveux des souris B7.2 Tg L31 corrèle avec l'apparition et l'aggravation graduelle des symptômes

neurologiques. De plus, la fréquence de cellules T CD8⁺ présentant un phénotype effecteur de type T_{C1} augmente significativement dans le SNC des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques, ce qui indique une différenciation qui survient spécifiquement à l'organe cible. À partir des observations effectuées sur les souris B7.2 Tg L31 déficientes en cellules T CD4⁺ (I-Aβ^{-/-} B7.2 Tg L31 et CD4^{-/-} B7.2 Tg L31), d'importantes conclusions peuvent être tirées. Premièrement, parce que les souris I-Aβ^{-/-} B7.2 Tg L31 ou CD4^{-/-} B7.2 Tg L31 montrent des symptômes neurologiques identiques à ceux qui sont observés chez les souris I-Aβ^{+/+} B7.2 Tg L31 ou CD4^{+/+} B7.2 Tg L31, il est clair que les cellules T CD8⁺ suffisent à causer des dommages à la gaine de myéline, qu'ils soient directs ou non. Ces observations supportent le postulat selon lequel l'activation et la différenciation des cellules T CD8⁺ est indépendante des cellules T CD4⁺ lorsqu'activées par une CPA professionnelle dans un contexte de costimulation adéquat (Bennett S. R. et al. 1998, Ridge J. P. et al. 1998, Schoenberger S. P. et al. 1998). Deuxièmement, la pathogenèse accélérée observée chez les souris B7.2 Tg L31 déficientes en cellules T CD4⁺ indique un rôle de régulateurs immunologiques aux cellules T CD4⁺ dans les souris B7.2 Tg L31. Il est probable que l'absence de la sous-population des cellules T CD4⁺ CD25⁺ régulatrices (T_R) soit responsable du développement accéléré de cette pathologie autoimmune. En effet, il a été rapporté que l'activité régulatrice de cette population de cellules T spécialisées était requise pour le maintien de la tolérance périphérique des cellules T autoréactives dans divers modèles animaux d'autoimmunité dirigée contre des organes spécifiques comme la souris NOD (Salomon B. et al. 2000) et le modèle EAE (Furtado G. C. et al. 2001, Hori S. et al. 2002, Kohm A. P. et al. 2002). Ces cellules T_R sont capables de contrôler l'activation, la

– prolifération et la production d'IFN γ des cellules T CD8⁺ (Piccirillo C. A. et al. 2001). Même si le mécanisme exact par lequel les cellules T_R exercent leur capacité inhibitrice est encore inconnu, la production d'IL-10, l'expression de CTLA-4, la liaison de l'IL-2, l'expression de TGF β et l'inhibition par contact direct sont tous des mécanismes potentiels qui ont été proposés et qui sont activement investigués (Shevach E. M. 2002). Il a été démontré que les cellules T_R stimulées par leur antigène spécifique peuvent inhiber la prolifération de cellules T ayant une autre spécificité (Takahashi T. et al. 1998, Thornton A. M. et al. 2000, Yu P. et al. 2005), ce qui suggérait que les fonctions inhibitrices des cellules T_R étaient totalement non spécifiques. Dans certains modèles d'autoimmunité spécifique à un organe, la spécificité des cellules T_R peut influencer leur capacité à inhiber l'activité des cellules T autoréactives (Hori S. et al. 2002, Olivares-Villagomez D. et al. 2000, Tang Q. et al. 2004, Tarbell K. V. et al. 2004, Yu P. et al. 2005). Par exemple, les cellules T_R spécifiques à un antigène pancréatique sont beaucoup plus efficaces à prévenir le diabète que le transfert de cellules T_R polyclonales (Tang Q. et al. 2004, Tarbell K. V. et al. 2004) et ces cellules T_R spécifiques à un antigène pancréatique peuvent contrôler l'action de cellules T autoréactives dirigée contre plusieurs spécificités (Tarbell K. V. et al. 2004). Les cellules T_R spécifiques à un antigène de l'organe ciblé par les lymphocytes T autoréactifs ont également un avantage sur les cellules T_R non spécifiques pour prévenir l'autoimmunité dans un modèle EAE (Hori S. et al. 2002).

Les exigences migratoires des cellules T_R pour exercer leurs capacités inhibitrices sont très mal connues. Les cellules T_R pourraient prévenir l'activation initiale des cellules effectrices aux organes lymphoïdes ou agir sur les cellules effectrices

directement à l'organe visé. Une autre possibilité est celle où les cellules T_R inhiberaient les cellules T autoréactives à leur site d'activation, que ce site soit un organe lymphoïde ou l'organe visé par les cellules autoréactives. Dans un modèle EAE dans lequel le transfert de cellules T_R prévient la démyélinisation induite par l'immunisation avec MOG₃₅₋₅₅, on retrouve des cellules T_R transférées dans les ganglions lymphatiques et la rate, mais aucune cellule T_R transférée n'est détectée dans le SNC (Kohm A. P. et al. 2002), ce qui suggère évidemment que l'action des cellules T_R survient dans les organes lymphoïdes. Cependant, dans un autre modèle qui consiste à établir une inflammation du côlon par l'injection de cellules $CD4^+ CD25^-$ à une souris RAG $-/-$, on peut traiter la pathologie autoimmune en injectant des cellules T_R (Mottet C. et al. 2003). On retrouve les cellules T_R transférées aux ganglions mésentériques mais également en contact direct avec les cellules effectrices et des cellules $CD11c^+$ au niveau du colon inflammé (Mottet C. et al. 2003), ce qui suggère que l'activité des cellules T_R se manifeste à l'organe cible dans ce cas. Un paramètre important qui pourrait expliquer les différents résultats obtenus est la méthode utilisée pour stimuler l'autoimmunité. En effet, l'activation initiale des cellules T autoréactives dans le modèle EAE se fait clairement en périphérie par immunisation avec le peptide MOG₃₅₋₅₅, ce qui n'est pas nécessairement le cas lors du transfert des cellules $CD4^+ CD25^-$ dans un animal immunodéficient dans lequel les cellules autoréactives sont plutôt stimulées à l'organe visé. Le co-transfert de cellules T $CD8^+$ avec des cellules T $CD4^+$ ou non de la sous-population $CD25^+$ dans de jeunes souris $CD4^-/-$ B7.2 Tg L31 permettrait de vérifier si c'est effectivement l'absence des cellules $CD4^+ CD25^+$ qui accélère le bri de tolérance des cellules T $CD8^+$ autoréactives dans les souris B7.2 Tg L31 déficientes en cellules T $CD4^+$. Néanmoins, parce que les

souris B7.2 Tg L31 développent les symptômes neurologiques en présence d'une population de cellules T_R intacte, il semble que l'expression constitutive de la molécule B7.2 sur les cellules de la microglie est suffisante pour surpasser les fonctions inhibitrices des cellules T_R . L'ensemble de ces résultats suggère que les cellules T $CD8^+$ autoréactives et spécifiques pour des neuroautoantigènes s'engageraient dans un processus de reconnaissance et d'activation productif lors de leur interaction avec les cellules de la microglie exprimant B7.2 et ce, en dépit des mécanismes de tolérance périphériques exercés par les cellules T_R et indépendamment de l'aide des cellules T $CD4^+$.

5.0.5 Répertoire de cellules T $CD8^+$ retrouvé dans le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31

L'identification de la spécificité des cellules T autoréactives dans les différentes maladies autoimmunes et leurs modèles est évidemment un aspect important des recherches visant la compréhension et le traitement des différentes pathologies. Dans notre modèle, nous avons démontré que les souris B7.2 Tg L31 ayant un répertoire de cellules T restreint (souris OT-1 B7.2 Tg L31) étaient résistantes à l'infiltration de cellules T $CD8^+$ et au développement de la pathologie. Ces données suggèrent fortement que l'infiltration/expansion massive de cellules T $CD8^+$ dans le SNC des souris B7.2 Tg L31 n'est pas un événement indépendant de toute reconnaissance antigénique. De plus, nous avons démontré qu'un répertoire restreint de cellules T $CD8^+$ était présent dans le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 à la phase précoce de la pathologie et que ce

répertoire limité ne reflète pas la composition du répertoire périphérique des cellules T CD8⁺. La discordance observée entre le répertoire périphérique et celui présent à l'organe cible ainsi que l'analyse des séquences amino-peptidiques des régions CDR3 obtenues à partir du SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 symptomatiques suggère qu'une expansion oligoclonale de cellules T CD8⁺ spécifiques pour des neuroantigènes se développe directement dans le SNC des souris I-A β -/- B7.2 Tg L31. Logiquement, les cellules T CD8⁺ issues de ces expansions oligoclonales et retrouvées dans le SNC des différentes souris symptomatiques devraient partager un minimum de spécificité antigénique. Suite à l'analyse des séquences peptidiques des CDR3 prédominantes dans le SNC des cinq souris symptomatiques, nous avons constaté que la composition oligoclonale des cellules T CD8⁺ est unique pour chaque souris analysée. Le fait que des souris génétiquement identiques présentent exactement les mêmes symptômes neurologiques dérivés d'une démyélinisation tout en ayant des populations oligoclonales différentes dans le SNC mène à d'importantes interprétations. Premièrement, la présence de populations oligoclonales présentant des régions variables V β du TCR différentes dans le SNC de chaque souris analysée suggère une variabilité dans les répertoires naïfs des différentes souris symptomatiques, variabilité qui se transpose dans la population oligoclonale de cellules T CD8⁺ autoréactives. Cette observation est principalement tributaire du processus essentiellement aléatoire observé lors du réarrangement des chaînes α et β du TCR (Davis M. M. et al. 1988). Cette variabilité dans les répertoires naïfs et dans les répertoires retrouvés dans le SNC n'exclut cependant pas une spécificité commune pour les clones prédominants. Il a été démontré qu'il y a une variation dans la réponse des cellules T CD8⁺ pour un épitope viral donné dans des souris génétiquement

identiques et élevées dans des environnements identiques et que cette variation était due à une variabilité dans les répertoires de cellules T naïves (Bouso P. et al. 1998, Lin M. Y. et al. 1998). Cette spécificité individuelle a été également observée dans des patients atteints de sclérose en plaques qui partagent une expansion apparente de cellules T $V\beta 5.2^+$ dans le sang périphérique mais où chaque patient montre différents clones prédominants (Matsumoto Y. et al. 2003). D'autres études rapportent que certains TCR sont prédominants parmi les clones de cellules T spécifiques pour la protéine MBP mais qu'ils varient entre des patients qui sont jumeaux monozygotiques (Shanmugam A. et al. 1996, Shanmugam A. et al. 1994), suggérant aussi une restriction spécifique individuelle.

Trois possibilités se posent quant à la nature des autoantigènes reconnus par les cellules T $CD8^+$ autoréactives dans le SNC des souris de la lignée 31. Il est possible que les différentes chaînes $TCR\beta$ prédominantes et trouvées dans les différentes souris symptomatiques s'associent à différentes chaînes $TCR\alpha$ et forment différents TCR qui reconnaissent des neuroantigènes issus de différentes protéines dérivées ou non de la myéline. Cependant, le fait que les symptômes neurologiques ainsi que la cinétique de la pathogenèse soient nettement conservés entre les souris argue contre cette hypothèse. Il est également possible que les différents TCRs reconnaissent différents épitopes de la même protéine, ce qui expliquerait la similarité des symptômes observés et la variabilité des régions CDR3 prédominantes pour chaque souris symptomatique. Finalement, il se peut que les différentes combinaisons de chaînes $TCR\beta$ et $TCR\alpha$ conservent la même structure de reconnaissance tridimensionnelle malgré la disparité au niveau de la séquence peptidique primaire, permettant ainsi de reconnaître exactement le même épitope avec différentes chaînes $TCR\beta$. Cette possibilité que de multiples clones de

cellules T CD8⁺ soient tous spécifiques à un épitope donné malgré l'utilisation de différents TCR a été démontrée dans plusieurs modèles d'infection (Cole G. A. et al. 1994, Horwitz M. S. et al. 1994, Ishikawa T. et al. 1998, Naumov Y. N. et al. 1998). L'utilisation des différentes régions variables V α par les cellules T CD8⁺ infiltrant le SNC des différentes souris symptomatiques n'a pas été analysée, mais il est possible que cette utilisation des régions variables V α soient plus homogènes que celle des régions variables V β , ce qui renforcerait l'hypothèse d'un autoantigène commun à toutes les souris symptomatiques. Ce phénomène a été observé chez les souris NOD dans lesquelles les lignées de lymphocytes CD8⁺ établies à partir des lésions précoces du pancréas sont constituées de cellules présentant des TCRs formés de chaînes TCR β très différentes d'une souris à l'autre et de chaînes TCR α utilisées de façon beaucoup plus homogène parmi les différentes souris (DiLorenzo T. P. et al. 1998).

Malgré de nombreux efforts, nous ne sommes pas encore en mesure d'identifier le ou les autoantigènes responsables de l'activation des cellules T autoréactives dans notre modèle. Nous n'avons obtenu aucune réponse proliférative des cellules T CD8⁺ isolées du SNC et des ganglions lymphatiques de souris B7.2 Tg L31 symptomatiques contre des protéines et peptides dérivés de la gaine de myéline généralement utilisés dans l'EAE murine (MBP complète, le peptide MBP₈₉₋₁₀₁, le peptide MOG₃₅₋₅₅ et le peptide PLP₁₇₈₋₁₉₁). Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence de prolifération des lymphocytes T CD8⁺ isolés des souris B7.2 Tg L31 contre ces peptides. Premièrement, les peptides mentionnés sont utilisés dans les modèles EAE dépendants des cellules T CD4⁺ et les séquences peptidiques ont été choisies pour leur capacité à former des complexes peptide/CMH II et non à former les complexes peptide/CMH I nécessaires à

l'activation des cellules T CD8⁺. Deuxièmement, l'ajout d'une protéine ou d'un peptide exogène dans une culture in vitro favorise également la voie de présentation antigénique via le CMH II au détriment du CMH I. Finalement, il ne faut pas oublier que dans le modèle EAE les souris sont activement immunisées avec le peptide d'intérêt ce qui détermine la spécificité de la réponse autoimmune et qui augmente de beaucoup le nombre de lymphocytes T spécifiques à l'antigène que l'on peut isoler ultérieurement. L'absence de réponse contre les peptides testés n'exclut cependant certainement pas que les cellules T CD8⁺ infiltrant le SNC ne soient spécifiques à d'autres composantes protéiques de la myéline qui restent à être identifiées. Une façon plus appropriée de tester une spécificité potentielle des cellules T CD8⁺ trouvées dans le SNC des souris symptomatiques pour des peptides dérivés de la myéline serait de transfecter des lignées cellulaires capables de présenter efficacement des antigènes (i.e lignée EL-4) avec les ADNc des principales protéines qui composent la myéline (MOG, PLP, MBP) de façon à favoriser la présentation endogène par les molécules CMH I d'un large échantillonnage d'épitopes aux cellules T CD8⁺ autoréactives et de vérifier différents paramètres de stimulation (prolifération, production d'IL-2, production d'IFN γ). Évidemment, d'autres autoantigènes non dérivés de la myéline et qui sont présentés de façon endogène par les cellules de la microglie pourraient être responsables de l'activation initiale des cellules T CD8⁺ autoréactives chez les souris B7.2 Tg. Par exemple, la protéine S100 β est exprimée de façon endogène par les cellules de la microglie (Adami C. et al. 2001). Des cellules T spécifiques pour S100 β sont capables de transférer l'EAE chez le rat (Kojima K. et al. 1997) et des lymphocytes T dérivées du sang de patients atteints de sclérose en plaques ont démontré une réponse contre S100 β (Schmidt S. et al. 1997). Même si la

spécificité exacte des cellules T CD8⁺ effectrices isolées du SNC des souris B7.2 Tg L31 n'a pu être déterminée, la démonstration que l'infiltration, l'expansion oligoclonale et la différenciation des cellules T CD8⁺ étaient spécifiques dans le SNC suggère fortement une reconnaissance antigénique directement à l'organe ciblé.

5.0.6 Évolution du répertoire des lymphocytes T CD8⁺ infiltrants le SNC

Au paroxysme des symptômes, soit à l'âge de 10 semaines, les souris I-A β -/- B7.2 Tg L31 présentent un répertoire de cellules T dans le SNC plus diversifié que celui observé chez des souris plus jeunes chez lesquelles la pathologie est à un stade moins avancé. Cet accroissement progressif de la complexité du répertoire qui accompagne l'aggravation des symptômes est probablement attribuable au recrutement non spécifique de cellules T par les cytokines et chemokines inflammatoires présentes. L'altération du répertoire des cellules T infiltrant le SNC selon la sévérité des symptômes n'est pas unique au modèle de souris B7.2 Tg L31. En effet, l'augmentation de la diversité du répertoire de cellules T présentes à l'organe cible qui accompagne l'aggravement des symptômes est aussi observée durant la pathogenèse de l'EAE, et ce même si la pathologie est induite par le transfert adoptif d'une lignée clonale de cellules T encéphalitogéniques (Fritz R. B. et al. 2000). Chez le modèle de démyélinisation induite par le virus de Theiler, le répertoire des cellules T infiltrantes est très restreint à l'initiation de la pathologie et devient beaucoup plus hétérogène avec la progression des symptômes (Kang J. A. et al. 2000). Finalement, les lymphocytes du sang périphériques (LSP) des patients atteints de la sclérose en plaques présentent également une hétérogénéité de cellules T spécifiques pour la MBP qui corrèle la sévérité des

symptômes (Laplaud D. A. et al. 2004, Utz U. et al. 1994) et il a été démontré que cette hétérogénéité au niveau des cellules T touche principalement les cellules T CD8⁺ chez les patients (Laplaud D. A. et al. 2004).

Même si dans le modèle d'autoimmunité spontanée NOD plusieurs antigènes reconnus par les lymphocytes diabétogéniques ont été identifiés (insuline, GAD, "insulinoma-associated protein 2" (IA-2) et la protéine chaperonne 60 (Hsp60) (Lieberman S. M. et al. 2003), l'autoantigène initial qui est responsable de la destruction des îlots pancréatiques n'a pas encore été identifié. Cette identification est très difficile en raison de la dégénérescence épitopique, un processus qui fait en sorte que des réponses secondaires contre d'autres antigènes du même tissu surviennent rapidement suite à la réponse initiale (Kaufman D. L. et al. 1993, Ott P. A. et al. 2004, Tisch R. et al. 1993). Ce processus de dégénérescence épitopique est également observé dans la pathogenèse des modèles EAE et TMEV-IDD où l'on observe la présence de lymphocytes T autoréactifs dans le SNC ayant une spécificité pour un neuroantigène différent de celui utilisé pour l'immunisation initiale (McMahon E. J. et al. 2005). Il est donc possible que l'accroissement de la complexité du répertoire observé chez les souris B7.2 Tg L31 sévèrement symptomatiques soit dû en partie à l'expansion d'une nouvelle vague de cellules T CD8⁺ autoréactives stimulées par les néo-épitopes libérés suite aux dommages initiaux causés à la gaine de myéline et présentés par les cellules de la microglie pleinement activées.

Évidemment, le recrutement secondaire de cellules T non spécifiques contribue sûrement beaucoup à la diversification du répertoire dans le SNC des souris sévèrement symptomatiques. Cette diversification du répertoire des cellules T présentes dans le SNC

est également observée dans le modèle EAE (Fritz R. B. et al. 2000) et dans le modèle induit par le virus de Theiler (Musette P. et al. 1995). Il a été démontré dans deux modèles de démyélinisation induit par un virus que le recrutement secondaire non spécifique de cellules T dans le SNC peut participer à la progression de la pathologie suite à la réponse spécifique initiale (Chen A. M. et al. 2005, McGavern D. B. et al. 2004). Dans le modèle LCMV, il est impossible d'induire la démyélinisation dans le SNC de souris infectées en absence de cellules T CD8⁺ spécifiques à un antigène viral (McGavern D. B. et al. 2004) ce qui suggère que l'initiation de la pathogenèse nécessite une reconnaissance spécifique dans le SNC et que l'action de cellules T CD8⁺ non spécifiques dans le SNC peut amplifier la pathologie mais pas l'initier. Une autre étude conduite dans le modèle MHV a également démontré que même si le recrutement secondaire de cellules T CD8⁺ non spécifiques dans le SNC formait une proportion importante de l'infiltrat durant la démyélinisation, les cellules T CD8⁺ non spécifiques recrutées ne contribuaient pas significativement à la pathogenèse en absence de reconnaissance spécifique (Chen A. M. et al. 2005).

5.0.7 L'activation des cellules de la microglie est une étape précoce de la pathogenèse conduisant vers la démyélinisation chez les souris B7.2 Tg L31

En comparant les niveaux d'expression des molécules CMH I et II, de la molécule B7.1 et du récepteur CD40 chez les cellules de la microglie, nous avons démontré que l'activation des cellules de la microglie précède les manifestations cliniques chez les souris B7.2 Tg L31. Nous avons également démontré que cette activation des cellules de la microglie requiert l'expression constitutive de la molécule B7.2 sur les cellules de la

microglie ainsi que la présence de cellules T. L'absence d'activation des cellules de la microglie chez les souris OT-1 B7.2 Tg L31 suggère que l'activation des cellules de la microglie nécessite une reconnaissance antigénique par les lymphocytes T directement dans le SNC.

L'absence de cellules de la microglie activées corrèle systématiquement avec l'absence de tout symptômes neurologiques chez les souris OT-1, RAG $-/-$ ou IFN γ R $-/-$ B7.2 Tg L31. Ces observations révèlent que l'activation des cellules de la microglie constitue une étape de la pathogenèse observée chez souris B7.2 Tg L31. Le rôle joué par l'activation des CPAs dans le bris de tolérance des cellules T autoréactives a été démontré dans différents modèles de diabète dans lesquels l'activation des CPAs, soit par l'injection d'un anticorps anti-CD40 (Garza K. M. et al. 2000) ou par infection virale (Ohashi P. S. et al. 1991), est nécessaire pour initier la destruction des îlots de Langerhans par des cellules T spécifiques. L'activation précoce des cellules de la microglie avant toute manifestation clinique est un phénomène également observé dans différents modèles de pathologies affectant le SNC. Durant la phase préclinique de l'EAE, soit 4 jours après le transfert de cellules T CD4⁺ MBP-TCR dans des souris receveuses irradiées, les cellules de la microglie augmentent leur expression des molécules CMH II, B7.2 et celle du récepteur CD40 (Ponomarev E. D. et al. 2005). Les cellules de la microglie sont également déjà activées à l'initiation des symptômes neurologiques dans le modèle TMEV-IDD (Mack C. L. et al. 2003). Des études antérieures ont démontré que les cellules de la microglie isolées à partir de souris C57BL/6 sont des CPAs incompetentes pour stimuler la prolifération et la production d'IL-2 de cellules T spécifiques à la protéine MBP (Ford A. L. et al. 1995). Par contre,

les cellules de la microglie isolées à partir du SNC de souris EAE symptomatiques expriment des niveaux significatifs des molécules B7.1, B7.2 et du CMH II et sont capables de stimuler la prolifération et la production d'IFN γ de cellules T spécifiques à la protéine MOG (Juedes A. E. et al. 2001). Dans ce même modèle, les auteurs ont également observé une corrélation entre le niveau d'activation des cellules de la microglie et la sévérité des symptômes. En effet, les niveaux d'expression des molécules B7.1, B7.2 et du CMH II ainsi que la capacité à stimuler des cellules T spécifiques des cellules de la microglie diminuent avec l'atténuation des symptômes 40 jours après l'induction de l'EAE (Juedes A. E. et al. 2001). Il semble donc qu'en augmentant l'expression des molécules du CMH et des molécules de costimulation B7, les cellules de la microglie activées haussent leur capacité de présentation et leur capacité costimulatoire nécessaires à la stimulation efficace de cellules T autoréactives brisant ainsi leur état de tolérance.

5.0.8 L'activation des cellules de la microglie et le développement des symptômes neurologiques requiert la signalisation de l'IFN γ R

Comme le démontre l'absence de symptômes neurologiques chez les souris IFN γ R^{-/-} B7.2 Tg L31, l'IFN γ produit par les cellules T CD8⁺ effectrices dans le SNC est crucial pour l'initiation du processus pathologique menant à la démyélinisation. Il s'avère également que l'activation des cellules de la microglie chez les souris B7.2 Tg L31 est dépendante de l'activité de l'IFN γ (Fig. 25).

Le rôle précis de l'IFN γ dans la pathogenèse de la sclérose en plaques n'est pas encore très bien établi, notamment parce que les résultats obtenus dans le modèle EAE ne

reflètent pas ceux obtenus chez des patients atteints de sclérose en plaques. Dans le modèle EAE induit par les cellules T CD4⁺, l'absence d'IFN γ (Ferber I. A. et al. 1996) ou de son récepteur (Willenborg D. O. et al. 1996) aggrave la pathologie chez les souris susceptibles et peut briser la résistance des souches de souris non susceptibles (Krakowski M. et al. 1996), suggérant que l'IFN γ limite l'activité des cellules T autoréactives. De plus, l'injection d'IFN γ par voie intrathécale réduit l'intensité et la durée des symptômes neurologiques observés dans l'EAE (Furlan R. et al. 2001). Contrairement au modèle EAE classique, l'infiltrat cellulaire retrouvé dans le SNC des souris EAE déficientes pour l'IFN γ ou l'IFN γ R n'est pas composé majoritairement de cellules T et de macrophages, mais bien dominé systématiquement par des neutrophiles (Krakowski M. et al. 1996, Tran E. H. et al. 2000, Willenborg D. O. et al. 1996, Zehntner S. P. et al. 2005). L'induction de l'apoptose chez les cellules T encéphalitogéniques (Chu C. Q. et al. 2000, Martino G. et al. 2000), la composition de l'infiltrat cellulaire (Tran E. H. et al. 2000) et la stimulation de la production d'oxyde d'azote (Willenborg D. O. et al. 1999) sont tous des mécanismes proposés pour le contrôle des cellules T encéphalitogéniques par l'IFN γ dans le modèle EAE.

Une étude récente a identifié une population de cellules T CD4⁺ très pathogéniques qui sont associées avec l'inflammation et l'autoimmunité dirigée contre le SNC et qui sont caractérisées par la production d'IL-17, d'IL-6 et de TNF (Langrish C. L. et al. 2005). L'expansion de cette population nommée Th_{IL-17} est dépendante de l'activité de l'IL-23. Cette étude a également démontré que le traitement de souris EAE avec un anticorps anti-IFN γ aggravait la sévérité des symptômes alors qu'un traitement avec un anticorps anti-IL-17 améliorait leur état. Ces résultats suggèrent donc que dans le modèle

EAE induit par les cellules T CD4⁺, c'est l'IL-17 (et indirectement l'IL-23 qui stimule la production d'IL-17 par les Th_{IL-17}) qui contribue à la pathogenèse et non l'IFN γ . Parce que l'activité de l'IFN γ est critique dans la pathogenèse observée chez les souris B7.2 Tg L31, il serait intéressant de vérifier si cette population Th_{IL-17} est présente ou non dans le SNC des souris B7.2 Tg L31 symptomatiques et de vérifier si une sous-population équivalente existe chez les cellules T CD8⁺ encéphalitogéniques.

D'autre part, l'IFN γ favoriserait la pathogenèse de la sclérose en plaques et favoriserait l'autoimmunité dans différents modèles animal. En effet, l'injection d'IFN γ par voie intraveineuse chez les patients atteints de la sclérose en plaques (forme cyclique) mène à une détérioration de l'état clinique de près de la moitié de la cohorte (7/18) et ce, indépendamment de la dose administrée (Panitch H. S. et al. 1987). Des patients atteints de la forme progressive secondaire de la sclérose en plaques ayant reçu un anticorps anti-IFN γ ont vu leur état clinique s'améliorer (Skurkovich S. et al. 2001). Il apparaît également que le niveau d'IFN γ dans le sang et le liquide encéphalo-rachidien des patients atteints de sclérose en plaques augmente avec l'exacerbation des symptômes (Link J. et al. 1994). Il a été démontré dans un modèle EAE induit par les cellules T CD8⁺ que la coinjection intrathécale de cellules T CD8⁺ encéphalitogéniques avec un anticorps anti-IFN γ réduisait significativement la sévérité des symptômes (Huseby E. S. et al. 2001). La souris NOD est un modèle d'autoimmunité spontanée dirigée contre les cellules β du pancréas dans lequel les cellules effectrices sont des cellules T diabétogéniques. Il a été démontré que l'IFN γ stimulait la destruction des cellules β et que le traitement avec des anticorps anti-IFN γ ainsi que l'absence du gène de l'IFN γ ou de son récepteur retardaient le développement du diabète dans ce modèle (Debray-Sachs

M. et al. 1991, Hultgren B. et al. 1996, Serreze D. V. et al. 2000, Wang B. et al. 1997). Les résultats obtenus chez la souris B7.2 Tg L31 démontrent clairement que l'IFN γ participe à la pathogenèse observée. Ces observations sont en accord avec le rôle présumé de l'IFN γ chez les patients atteints de sclérose en plaques, dans le modèle EAE induit par les cellules T CD8 $^{+}$ et dans le modèle NOD.

La disparité des conclusions quant au rôle de l'IFN γ dans les pathologies autoimmunes tirées des études entre le modèle EAE induit par les cellules CD4 $^{+}$ et les autres modèles animaux ou patients atteints de sclérose en plaques, suggère qu'un ou des éléments mécanistiques diffèrent entre les différentes pathogenèses. L'implication des cellules CD8 $^{+}$ constitue une différence importante entre le modèle EAE classique induit par les cellules T CD4 $^{+}$ versus le modèle EAE induit par les cellules T CD8 $^{+}$, le modèle B7.2 Tg L31, le modèle NOD et les patients atteints de sclérose en plaques. Il a été clairement démontré que des cellules T CD8 $^{+}$ spécifiques pour des peptides dérivés de la myéline sont encéphalitogéniques lorsque transférées à un animal receveur et sont capables d'induire l'EAE (Ford M. L. et al. 2005, Huseby E. S. et al. 2001, Sun D. et al. 2001). Avec les souris I-A β $^{-/-}$ B7.2 Tg L31 et CD4 $^{-/-}$ B7.2 Tg L31, nous avons démontré que les cellules T CD8 $^{+}$ sont les cellules T effectrices dans la pathologie démyélinisante affectant les souris B7.2 Tg L31. Dans le modèle NOD, les cellules T CD4 $^{+}$ et CD8 $^{+}$ sont considérées comme des médiateurs majeurs de la pathologie (Bendelac A. et al. 1987, Wicker L. S. et al. 1986). Cependant, certaines études ont mis en évidence le rôle fondamental des cellules T CD8 $^{+}$ dans la pathogenèse du diabète. Par exemple, le transfert de clones T CD8 $^{+}$ diabétogéniques cause le diabète dans l'animal receveur en absence de cellules T CD4 $^{+}$ (Wong F. S. et al. 1996) et les souris NOD

déficientes en cellules T CD8⁺ sont résistantes au développement du diabète (Wang B. et al. 1996). Finalement, même si aucune preuve définitive n'existe, diverses études suggèrent un rôle majeur des cellules T CD8⁺ dans la sclérose en plaques (Babbe H. et al. 2000, Hauser S. L. et al. 1986, Jacobsen M. et al. 2002, Skulina C. et al. 2004).

Donc, parmi toutes ces pathologies dans lesquelles on détecte une forte production d'IFN γ à l'organe ciblé par l'autoimmunité, seul le modèle EAE induit par les cellules T CD4⁺ présente l'IFN γ comme une cytokine qui ne favorise pas la pathogenèse. À partir de ces observations, on peut envisager que les cellules T CD4⁺ et CD8⁺ sont affectées différemment par l'activité de l'IFN γ sur le SNC. L'activité encéphalitogénique des cellules T CD4⁺ spécifiques est conservée lors de leur transfert à un animal receveur IFN γ R -/- et serait par conséquent plutôt indépendante des effets de l'IFN γ sur l'environnement glial. Pour leur part, les cellules T CD8⁺ nécessiteraient le conditionnement pro-inflammatoire de l'environnement glial par l'IFN γ pour exercer pleinement leur activité encéphalitogénique. Ce conditionnement par l'IFN γ peut inclure non seulement l'augmentation de l'expression des molécules de costimulation B7 et des molécules du CMH I par les cellules de la microglie, mais également l'augmentation des molécules du CMH I par des cellules potentiellement ciblées par les cellules T CD8⁺ autoréactives comme les oligodendrocytes et les neurones.

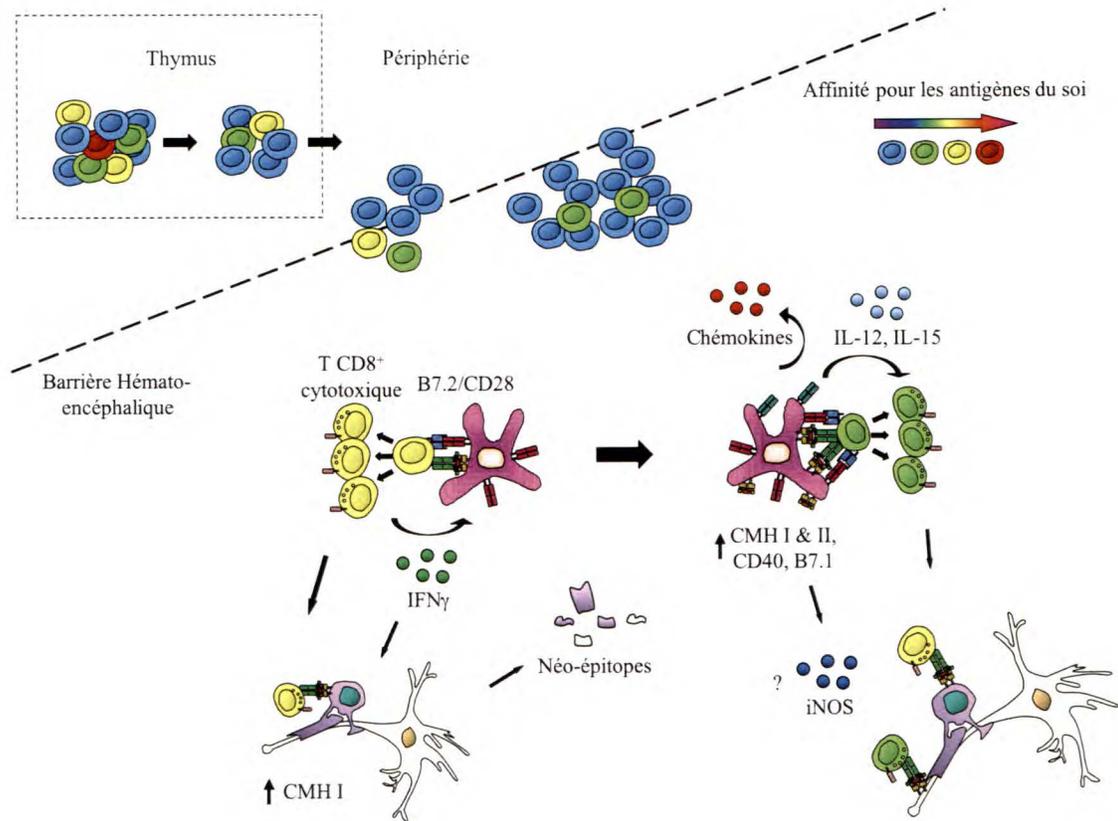
5.0.9 La pathogenèse du processus de démyélinisation spontanée observée chez les souris B7.2 Tg L31

La sclérose en plaques est une maladie dont l'évolution clinique et la réponse aux différentes thérapies sont très hétérogènes (Sospedra M. et al. 2005). Cette hétérogénéité

pathologique suggère que le processus pathogénique de démyélinisation puisse inclure des mécanismes communs mais aussi des mécanismes qui diffèrent d'un sous-groupe de patients à l'autre. Les divergences pourraient inclure une participation différente des lymphocytes T CD4⁺ et CD8⁺ dans les différents processus de démyélinisation. Les résultats obtenus permettent de suggérer une pathogenèse possible pour le processus de démyélinisation spontanée observé chez les souris B7.2 Tg L31 (Schéma 1).

Les cellules T sont absolument nécessaires au développement de la pathologie observée dans les souris B7.2 Tg L31 et nous avons démontré que la participation des cellules T CD8⁺ est suffisante au processus de démyélinisation. L'entrée des lymphocytes T dans le SNC est donc la première étape de la pathogenèse. Les cellules T mémoires traversent très efficacement la barrière hémato-encéphalique (Hickey W. F. 2001) et leur seuil d'activation est réduit comparativement aux cellules T naïves (London C. A. et al. 2000), ce qui confère aux cellules T mémoires la capacité d'influencer la pathogenèse à deux niveaux. Premièrement, une circulation accrue au niveau du SNC des souris B7.2 Tg L31 accroît la probabilité qu'un ou des lymphocytes T autoréactifs spécifiques pour des neuroantigènes rencontrent leur épitope. Deuxièmement, il est possible que les cellules T mémoires autoréactives ayant une affinité modérée pour un neuroantigène soient activées par leur épitope spécifique dans des conditions de stimulation qui seraient insuffisantes pour l'activation de cellules T autoréactives naïves ou mémoires ayant une plus faible affinité pour un autoantigène. Il est clair cependant que la fréquence élevée de lymphocytes T mémoires chez les souris B7.2 Tg L31 n'est pas suffisante pour initier une réaction autoimmune dirigée contre le SNC car aucun

Schéma 1



symptôme clinique n'a été observé chez les souris B7.2 Tg L27 dans lesquelles la fréquence de lymphocytes T mémoires est aussi élevée.

Nous avons déterminé que l'expression constitutive de la molécule de costimulation B7.2 par les cellules de la microglie est cruciale pour le développement de manifestations cliniques et que la présentation d'autoantigènes en conjonction avec des signaux de costimulation par des cellules présentatrices d'antigènes résidentes à l'organe sont suffisants pour briser la tolérance de cellules T autoréactives. Cette activation des cellules T autoréactives directement dans le SNC constitue la deuxième étape de la pathogenèse affectant les souris B7.2 Tg L31. Des résultats obtenus par un autre groupe suggèrent également que l'augmentation de l'expression des molécules B7 dans le SNC pouvait briser la tolérance des cellules autoréactives. En effet, il a été démontré que des cellules T arborant un TCR transgénique spécifique à la myéline sont tolérantes lorsqu'elles rencontrent l'antigène dans le SNC (Brabb T. et al. 2000) et que l'injection de toxine de pertussis ou des antigènes mycobactériens dans ces mêmes souris induit l'expression des molécules de costimulation B7 et mène à l'activation des cellules T au TCR Tg autoréactives (Brabb T. et al. 1997).

Nous avons démontré que les cellules T CD8⁺ autoréactives activées forment une population oligoclonale dans le SNC et produisent des quantités significatives de la cytokine pro-inflammatoire IFN γ *ex vivo*. La signalisation par le récepteur de l'IFN γ est absolument requise pour l'activation des cellules de la microglie qui survient très tôt dans la pathogenèse. Il est probable que l'activation des cellules de la microglie par l'IFN γ et que l'augmentation de l'expression du CMH I sur les oligodendrocytes et les neurones suite à leur stimulation par l'IFN γ soient nécessaires pour que les cellules T CD8⁺

cytotoxiques restreintes au CMH I puissent causer des dommages. En effet, même si il a été démontré que les oligodendrocytes et les neurones expriment des niveaux significatifs de molécules du CMH I sous des conditions pro-inflammatoires et dans les plaques de démyélinisation (Hoftberger R. et al. 2004), le niveau d'expression des molécules du CMH I est très faible dans le SNC en absence d'inflammation (Joly E. et al. 1991). De plus, il a été démontré *in vitro* que les oligodendrocytes et les neurones isolés de souris C57BL/6 ne sont susceptibles à la cytolysse des cellules T CD8⁺ cytotoxiques qu'après l'augmentation d'expression des molécules du CMH I suite au traitement avec IFN γ (Medana I. et al. 2001). Nous proposons donc que la production d'IFN γ par les cellules T autoréactives activées est nécessaire à l'activation des cellules de la microglie mais aussi nécessaire à l'expression des molécules du CMH I sur les oligodendrocytes et neurones.

L'augmentation de l'expression des molécules des CMH de classe I et II et de la molécule de costimulation B7.1 indique que le potentiel de présentation antigénique des cellules de la microglie dans les souris B7.2 Tg L31 est accru suite à leur activation. Cette observation soulève la possibilité que les cellules de la microglie activées puissent stimuler efficacement un certain nombre de cellules T autoréactives avec une faible affinité qui s'ajoutent aux cellules T encéphalitogéniques déjà activées au cours du développement de la réponse inflammatoire au SNC.

Nous avons démontré qu'à un stade avancé de la pathogenèse, le répertoire de cellules T CD8⁺ présent dans le SNC est très hétérogène. À ce stade, il est possible que l'on retrouve dans le SNC des cellules T recrutées non spécifiquement par l'environnement inflammatoire ainsi que des cellules T autoréactives avec des affinités et des spécificités différentes que celles des cellules T autoréactives qui ont initié la réponse

autoimmune. L'addition de ces populations lymphocytaires a pour conséquence d'augmenter la diversité de cellules T CD8⁺ présentes dans le SNC. Compte tenu de cet influx massif de lymphocytes T avec un phénotype mémoire/effecteur au SNC et qu'il a été démontré que des lymphocytes T CD8⁺ pouvaient induire le processus de démyélinisation en absence de reconnaissance antigénique (Haring J. S. et al. 2002), il est possible que l'action de ces cellules T CD8⁺ non spécifiques recrutées au SNC puisse amplifier la pathologie. Il est cependant également possible que le recrutement secondaire de cellules T CD8⁺ non spécifiques à des antigènes du SNC forme une proportion importante de l'infiltrat durant un stade avancé de la pathogenèse mais ne contribuent pas significativement à la pathogenèse en absence de reconnaissance spécifique, comme suggéré par une autre étude conduite dans le modèle MHV (Chen A. M. et al. 2005).

Il est possible que les dommages à la gaine de myéline et aux axones soient dus en partie à l'activité cytotoxique directe des cellules T CD8⁺ autoréactives restreintes au CMH classe I exprimés par les oligodendrocytes et les axones neuronaux en milieu pro-inflammatoire. Cependant, il n'est pas exclu que les cellules de la microglie et les macrophages périvasculaires activés participent également à la démyélinisation par la sécrétion de médiateurs neurotoxiques comme des réactifs oxygénés, de l'oxyde nitrique et des enzymes lysosomales (Heppner F. L. et al. 2005, Raivich G. et al. 2004). Des données préliminaires indiquent que les cellules de la microglie isolées de souris B7.2 Tg L31 symptomatiques produisent des niveaux plus élevés d'oxyde nitrique que les cellules de la microglie isolées de souris contrôles, mais nous n'avons pas encore établi si cette production d'oxyde nitrique est significative pathologiquement. Le croisement des souris

B7.2 Tg L31 avec des souris déficientes pour l'oxyde nitrique synthétase (iNOS -/-) est en cours.

6.0 Conclusion

Notre modèle de démyélinisation reflète l'émergence spontanée de cellules T autoréactives spécifiques au système nerveux à partir d'un répertoire périphérique polyclonal, un processus immunopathogénique qui se produit possiblement durant la pathogenèse de la sclérose en plaques. Notre modèle représente également la première démonstration que l'expression constitutive d'une molécule de costimulation par les cellules de la microglie au système nerveux brise la tolérance des cellules T autoréactives et initie le développement d'une réponse autoimmune spontanée spécifique à l'organe exprimant la molécule de costimulation. Parce que les infections affectant le SNC et les infections systémiques constituent les principaux événements physiologiques qui affectent l'expression des molécules de costimulation B7 au SNC, notre modèle supporte l'hypothèse selon laquelle ces mêmes infections pourraient être responsables de l'induction de l'autoimmunité dans le SNC chez un individu génétiquement susceptible. Contrairement à la plupart des modèles animaux de la sclérose en plaques existants dans lesquels les cellules encéphalitogéniques sont des cellules T CD4⁺, notre modèle permet d'étudier des mécanismes pathogéniques particuliers aux cellules T CD8⁺ dans le processus de démyélinisation. Les données recueillies serviront à mieux saisir le rôle des cellules T CD8⁺ chez les patients atteints de sclérose en plaques.

En conclusion, notre modèle peut servir de plate-forme expérimentale pour disséquer les mécanismes immunopathologiques fondamentaux impliqués dans le processus d'autoimmunité dirigée contre un organe spécifique ainsi que pour tester de nouvelles thérapies potentielles.

Remerciements

Je remercie tout particulièrement Dr. Sylvie Fournier, ma directrice de thèse, pour tout le support financier, matériel et surtout humain qu'elle m'a fourni tout au long de mon projet de doctorat. Je remercie également Dr. Simone Zehntner, une collaboratrice de tous les instants, pour son travail acharné et tous les bons moments partagés en sa compagnie. Je remercie tous les étudiants et stagiaires que j'ai côtoyés durant mon doctorat pour la belle ambiance au laboratoire. De plus, je remercie la Société Canadienne de la Sclérose en Plaques et le CIHR Neuroinflammation Training Program pour les bourses salariales. Finalement, je remercie les évaluateurs de cette thèse de même que les membres du service d'immunologie de l'université de Sherbrooke pour m'avoir permis de compléter mon projet de doctorat à l'extérieur de l'université.

Références

Acuto O., Mise-Omata S., Mangino G. and Michel F. 2003. "Molecular modifiers of T cell antigen receptor triggering threshold: the mechanism of CD28 costimulatory receptor." *Immunol Rev.* 192: 21-31.

Adami C., Sorci G., Blasi E., Agneletti A. L., Bistoni F. and Donato R. 2001. "S100B expression in and effects on microglia." *Glia.* 33: 131-42.

Adorini L., Gregori S. and Harrison L. C. 2002. "Understanding autoimmune diabetes: insights from mouse models." *Trends Mol Med.* 8: 31-8.

Alegre M. L., Noel P. J., Eisfelder B. J., Chuang E., Clark M. R., Reiner S. L. and Thompson C. B. 1996. "Regulation of surface and intracellular expression of CTLA4 on mouse T cells." *J Immunol.* 157: 4762-70.

Allison J., Stephens L. A., Kay T. W., Kurts C., Heath W. R., Miller J. F. and Krummel M. F. 1998. "The threshold for autoimmune T cell killing is influenced by B7-1." *Eur J Immunol.* 28: 949-60.

Aloisi F. 2001. "Immune function of microglia." *Glia.* 36: 165-79.

Antel J., Bania M., Noronha A. and Neely S. 1986. "Defective suppressor cell function mediated by T8+ cell lines from patients with progressive multiple sclerosis." *J Immunol.* 137: 3436-9.

Antel J. P., Nicholas M. K., Bania M. B., Reder A. T., Arnason B. G. and Joseph L. 1986. "Comparison of T8+ cell-mediated suppressor and cytotoxic functions in multiple sclerosis." *J Neuroimmunol.* 12: 215-24.

Antony J. M., van Marle G., Opii W., Butterfield D. A., Mallet F., Yong V. W., Wallace J. L., Deacon R. M., Warren K. and Power C. 2004. "Human endogenous retrovirus glycoprotein-mediated induction of redox reactants causes oligodendrocyte death and demyelination." *Nat Neurosci.* 7: 1088-95.

Arima T., Rehman A., Hickey W. F. and Flye M. W. 1996. "Inhibition by CTLA4Ig of experimental allergic encephalomyelitis." *J Immunol.* 156: 4916-24.

Ascherio A. and Munch M. 2000. "Epstein-Barr virus and multiple sclerosis." *Epidemiology.* 11: 220-4.

Azuma M., Ito D., Yagita H., Okumura K., Phillips J. H., Lanier L. L. and Somoza C. 1993. "B70 antigen is a second ligand for CTLA-4 and CD28." *Nature.* 366: 76-9.

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

Balashov K. E., Khoury S. J., Hafler D. A. and Weiner H. L. 1995. "Inhibition of T cell responses by activated human CD8+ T cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis." *J Clin Invest.* 95: 2711-9.

Banchereau J. and Steinman R. M. 1998. "Dendritic cells and the control of immunity." *Nature.* 392: 245-52.

Becher B., Durell B. G., Miga A. V., Hickey W. F. and Noelle R. J. 2001. "The clinical course of experimental autoimmune encephalomyelitis and inflammation is controlled by the expression of CD40 within the central nervous system." *J Exp Med.* 193: 967-74.

Becher B., Durell B. G. and Noelle R. J. 2003. "IL-23 produced by CNS-resident cells controls T cell encephalitogenicity during the effector phase of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Clin Invest.* 112: 1186-91.

Bechmann I., Priller J., Kovac A., Bontert M., Wehner T., Klett F. F., Bohsung J., Stuschke M., Dirnagl U. and Nitsch R. 2001. "Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages." *Eur J Neurosci.* 14: 1651-8.

Beeson P. B. 1994. "Age and sex associations of 40 autoimmune diseases." *Am J Med.* 96: 457-62.

Belkaid Y., Von Stebut E., Mendez S., Lira R., Caler E., Bertholet S., Udey M. C. and Sacks D. 2002. "CD8+ T cells are required for primary immunity in C57BL/6 mice following low-dose, intradermal challenge with *Leishmania major*." *Journal of Immunology.* 168: 3992-4000.

Belz G. T., Wodarz D., Diaz G., Nowak M. A. and Doherty P. C. 2002. "Compromised influenza virus-specific CD8(+)-T-cell memory in CD4(+)-T-cell-deficient mice." *J Virol.* 76: 12388-93.

Ben-Nun A. and Lando Z. 1983. "Detection of autoimmune cells proliferating to myelin basic protein and selection of T cell lines that mediate experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) in mice." *J Immunol.* 130: 1205-9.

Ben-Nun A., Wekerle H. and Cohen I. R. 1981. "The rapid isolation of clonable antigen-specific T lymphocyte lines capable of mediating autoimmune encephalomyelitis." *Eur J Immunol.* 11: 195-9.

Bendelac A., Carnaud C., Boitard C. and Bach J. F. 1987. "Syngeneic transfer of autoimmune diabetes from diabetic NOD mice to healthy neonates. Requirement for both L3T4+ and Lyt-2+ T cells." *J Exp Med.* 166: 823-32.

Bennett S. R., Carbone F. R., Karamalis F., Flavell R. A., Miller J. F. and Heath W. R. 1998. "Help for cytotoxic-T-cell responses is mediated by CD40 signalling." *Nature.* 393: 478-80.

Benveniste E. N. 1998. "Cytokine actions in the central nervous system." *Cytokine Growth Factor Rev.* 9: 259-75.

Bevan M. J. 1976. "Cross-priming for a secondary cytotoxic response to minor H antigens with H-2 congenic cells which do not cross-react in the cytotoxic assay." *Journal of Experimental Medicine.* 143: 1283-8.

Bevan M. J. 1976. "Minor H antigens introduced on H-2 different stimulating cells cross-react at the cytotoxic T cell level during in vivo priming." *Journal of Immunology*. 117: 2233-8.

Biddison W. E., Cruikshank W. W., Center D. M., Pelfrey C. M., Taub D. D. and Turner R. V. 1998. "CD8+ myelin peptide-specific T cells can chemoattract CD4+ myelin peptide-specific T cells: importance of IFN-inducible protein 10." *J Immunol*. 160: 444-8.

Bitsch A., Schuchardt J., Bunkowski S., Kuhlmann T. and Bruck W. 2000. "Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation." *Brain*. 123 (Pt 6): 1174-83.

Boise L. H., Minn A. J., Noel P. J., June C. H., Accavitti M. A., Lindsten T. and Thompson C. B. 1995. "CD28 costimulation can promote T cell survival by enhancing the expression of Bcl-XL." *Immunity*. 3: 87-98.

Borriello F., Sethna, M. P., Boyd, S. D., Schweitzer, N. A., Tivol, E. A., Jacoby, D., Strom, T. B., Simpson, E. M., Freeman, G. J. and Sharpe, A. H. 1997. "B7-1 and B7-2 have overlapping, critical roles in immunoglobulin class switching and germinal center formation." *Immunity*. 6: 303-313.

Bourgeois C., Rocha B. and Tanchot C. 2002. "A role for CD40 expression on CD8(+) T cells in the generation of CD8(+) T cell memory." *Science*. 297: 2060-2063.

Bousso P., Casrouge A., Altman J. D., Haury M., Kanellopoulos J., Abastado J. P. and Kourilsky P. 1998. "Individual variations in the murine T cell response to a specific peptide reflect variability in naive repertoires." *Immunity*. 9: 169-78.

Brabb T., Goldrath A. W., von Dassow P., Paez A., Liggitt H. D. and Goverman J. 1997. "Triggers of autoimmune disease in a murine TCR-transgenic model for multiple sclerosis." *J. Immunol*. 159: 497-507.

Brabb T., von Dassow P., Ordonez N., Schnabel B., Duke B. and Goverman J. 2000. "In situ tolerance within the central nervous system as a mechanism for preventing autoimmunity." *J Exp Med*. 192: 871-80.

Brunet J. F., Denizot F., Luciani M. F., Roux-Dosseto M., Suzan M., Mattei M. G. and Golstein P. 1987. "A new member of the immunoglobulin superfamily--CTLA-4." *Nature*. 328: 267-70.

Brunner M. C., Chambers C. A., Chan F. K., Hanke J., Winoto A. and Allison J. P. 1999. "CTLA-4-Mediated inhibition of early events of T cell proliferation." *J Immunol*. 162: 5813-20.

Buller R. M., Holmes K. L., Hugin A., Frederickson T. N. and Morse H. C., 3rd. 1987. "Induction of cytotoxic T-cell responses in vivo in the absence of CD4 helper cells." *Nature*. 328: 77-9.

Carson M. J. 2002. "Microglia as liaisons between the immune and central nervous systems: functional implications for multiple sclerosis." *Glia*. 40: 218-31.

Carson M. J., Reilly C. R., Sutcliffe J. G. and Lo D. 1998. "Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells." *Glia*. 22: 72-85.

Caux C., Massacrier C., Vanbervliet B., Dubois B., Vankooten C., Durand I. and Banchereau J. 1994. "Activation of Human Dendritic Cells Through Cd40 Cross-Linking." *Journal of Experimental Medicine*. 180: 1263-1272.

Cella M., Scheidegger D., Palmerlehm K., Lane P., Lanzavecchia A. and Alber G. 1996. "Ligation of Cd40 On Dendritic Cells Triggers Production of High Levels of Interleukin-12 and Enhances T Cell Stimulatory Capacity - T-T Help Via Apc Activation." *Journal of Experimental Medicine*. 184: 747-752.

Challoner P. B., Smith K. T., Parker J. D., MacLeod D. L., Coulter S. N., Rose T. M., Schultz E. R., Bennett J. L., Garber R. L., Chang M. and et al. 1995. "Plaque-associated expression of human herpesvirus 6 in multiple sclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 92: 7440-4.

Chang T. T., Jabs C., Sobel R. A., Kuchroo V. K. and Sharpe A. H. 1999. "Studies in B7-deficient mice reveal a critical role for B7 costimulation in both induction and effector phases of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Exp Med*. 190: 733-40.

Chang T. T., Sobel R. A., Wei T., Ransohoff R. M., Kuchroo V. K. and Sharpe A. H. 2003. "Recovery from EAE is associated with decreased survival of encephalitogenic T cells in the CNS of B7-1/B7-2-deficient mice." *Eur J Immunol.* 33: 2022-2032.

Chen A. M., Khanna N., Stohlman S. A. and Bergmann C. C. 2005. "Virus-specific and bystander CD8 T cells recruited during virus-induced encephalomyelitis." *J Virol.* 79: 4700-8.

Chen C., Gault A., Shen L. and Nabavi N. 1994. "Molecular cloning and expression of early T cell costimulatory molecule-1 and its characterization as B7-2 molecule." *J Immunol.* 152: 4929-36.

Christensen J. E., Andreasen S. O., Christensen J. P. and Thomsen A. R. 2001. "CD11b expression as a marker to distinguish between recently activated effector CD8(+) T cells and memory cells." *Int Immunol.* 13: 593-600.

Chu C. Q., Wittmer S. and Dalton D. K. 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: 123-8.

Chuang E., Alegre M. L., Duckett C. S., Noel P. J., Vander Heiden M. G. and Thompson C. B. 1997. "Interaction of CTLA-4 with the clathrin-associated protein AP50 results in ligand-independent endocytosis that limits cell surface expression." *J Immunol.* 159: 144-51.

Clatch R. J., Miller S. D., Metzner R., Dal Canto M. C. and Lipton H. L. 1990. "Monocytes/macrophages isolated from the mouse central nervous system contain infectious Theiler's murine encephalomyelitis virus (TMEV)." *Virology.* 176: 244-54.

Cole G. A., Hogg T. L. and Woodland D. L. 1994. "The MHC class I-restricted T cell response to Sendai virus infection in C57BL/6 mice: a single immunodominant epitope elicits an extremely diverse repertoire of T cells." *Int Immunol.* 6: 1767-75.

Collins A. V., Brodie D. W., Gilbert R. J., Iaboni A., Manso-Sancho R., Walse B., Stuart D. I., van der Merwe P. A. and Davis S. J. 2002. "The interaction properties of costimulatory molecules revisited." *Immunity*. 17: 201-10.

Colton C. A., Snell J., Chernyshev O. and Gilbert D. L. 1994. "Induction of superoxide anion and nitric oxide production in cultured microglia." *Ann N Y Acad Sci*. 738: 54-63.

Compton H. L. and Farrell J. P. 2002. "CD28 costimulation and parasite dose combine to influence the susceptibility of BALB/c mice to infection with *Leishmania major*." *J Immunol*. 168: 1302-8.

Crawford M. P., Yan S. X., Ortega S. B., Mehta R. S., Hewitt R. E., Price D. A., Stastny P., Douek D. C., Koup R. A., Racke M. K. and Karandikar N. J. 2004. "High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay." *Blood*. 103: 4222-31.

Cresswell P. and Houde M. 2003. "Phagosomes are competent organelles for antigen cross-presentation.[see comment]." *Journal of Immunology*. 170: 4178-88.

Cross A. H., San M., Keeling R. M. and Karr R. W. 1999. "CTLA-4-Fc treatment of ongoing EAE improves recovery, but has no effect upon relapse rate. Implications for the mechanisms involved in disease perpetuation." *J Neuroimmunol*. 96: 144-7.

Crotty S., Andino R., Rock K. L. and Huang A. Y. 1999. "Bone marrow-derived cells present MHC class I-restricted tumour antigens in priming of antitumour immune responses." *Nature*. 398: 77-80.

Croxford J. L., O'Neill J. K., Ali R. R., Browne K., Byrnes A. P., Dallman M. J., Wood M. J., Fedlmann M. and Baker D. 1998. "Local gene therapy with CTLA4-immunoglobulin fusion protein in experimental allergic encephalomyelitis." *Eur J Immunol*. 28: 3904-16.

Cuomo L., Trivedi P., Cardillo M. R., Gagliardi F. M., Vecchione A., Caruso R., Calogero A., Frati L., Faggioni A. and Ragona G. 2001. "Human herpesvirus 6 infection in neoplastic and normal brain tissue." *J Med Virol*. 63: 45-51.

Dal Canto M. C. and Lipton H. L. 1977. "Multiple sclerosis. Animal model: Theiler's virus infection in mice." *Am J Pathol.* 88: 497-500.

Dasgupta S., Jana M., Liu X. and Pahan K. 2002. "Myelin basic protein-primed T cells induce nitric oxide synthase in microglial cells. Implications for multiple sclerosis." *J Biol Chem.* 277: 39327-33.

Dasgupta S., Jana M., Liu X. and Pahan K. 2003. "Role of very-late antigen-4 (VLA-4) in myelin basic protein-primed T cell contact-induced expression of proinflammatory cytokines in microglial cells." *J Biol Chem.* 278: 22424-31.

Davis M. M. and Bjorkman P. J. 1988. "T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition." *Nature.* 334: 395-402.

Debray-Sachs M., Carnaud C., Boitard C., Cohen H., Gresser I., Bedossa P. and Bach J. F. 1991. "Prevention of diabetes in NOD mice treated with antibody to murine IFN gamma." *J Autoimmun.* 4: 237-48.

Deckert-Schluter M., Bluethmann H., Kaefer N., Rang A. and Schluter D. 1999. "Interferon-gamma receptor-mediated but not tumor necrosis factor receptor type 1- or type 2-mediated signaling is crucial for the activation of cerebral blood vessel endothelial cells and microglia in murine *Toxoplasma* encephalitis." *Am J Pathol.* 154: 1549-61.

Dessau R. B., Lisby G. and Frederiksen J. L. 2001. "Coronaviruses in brain tissue from patients with multiple sclerosis." *Acta Neuropathol (Berl).* 101: 601-4.

Di Trapani G., Carnevale A., Cioffi R. P., Massaro A. R. and Profice P. 1996. "Multiple sclerosis associated with peripheral demyelinating neuropathy." *Clin Neuropathol.* 15: 135-8.

DiLorenzo T. P., Graser R. T., Ono T., Christianson G. J., Chapman H. D., Roopenian D. C., Nathanson S. G. and Serreze D. V. 1998. "Major histocompatibility complex class I-restricted T cells are required for all but the end stages of diabetes development in nonobese diabetic mice and use a prevalent

T cell receptor alpha chain gene rearrangement." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 95: 12538-43.

Dixon J. E., Allan J. E. and Doherty P. C. 1987. "The acute inflammatory process in murine lymphocytic choriomeningitis is dependent on Lyt-2+ immune T cells." *Cell Immunol.* 107: 8-14.

Doherty P. C., Allan J. E. and Ceredig R. 1988. "Contributions of host and donor T cells to the inflammatory process in murine lymphocytic choriomeningitis." *Cell Immunol.* 116: 475-81.

Dressel A., Chin J. L., Sette A., Gausling R., Hollsberg P. and Hafler D. A. 1997. "Autoantigen recognition by human CD8 T cell clones: enhanced agonist response induced by altered peptide ligands." *J Immunol.* 159: 4943-51.

Ehrlich G. D., Glaser J. B., Bryz-Gornia V., Maese J., Waldmann T. A., Poiesz B. J. and Greenberg S. J. 1991. "Multiple sclerosis, retroviruses, and PCR. The HTLV-MS Working Group." *Neurology.* 41: 335-43.

Ellmerich S., Mycko M., Takacs K., Waldner H., Wahid F. N., Boyton R. J., King R. H., Smith P. A., Amor S., Herlihy A. H., Hewitt R. E., Jutton M., Price D. A., Hafler D. A., Kuchroo V. K. and Altmann D. M. 2005. "High incidence of spontaneous disease in an HLA-DR15 and TCR transgenic multiple sclerosis model." *J Immunol.* 174: 1938-46.

Fabrick B. O., Van Haastert E. S., Galea I., Polfliet M. M., Dopp E. D., Van Den Heuvel M. M., Van Den Berg T. K., De Groot C. J., Van Der Valk P. and Dijkstra C. D. 2005. "CD163-positive perivascular macrophages in the human CNS express molecules for antigen recognition and presentation." *Glia.* 51: 297-305.

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

Flugel A., Berkowicz T., Ritter T., Labeur M., Jenne D. E., Li Z., Ellwart J. W., Willem M., Lassmann H. and Wekerle H. 2001. "Migratory activity and

functional changes of green fluorescent effector cells before and during experimental autoimmune encephalomyelitis." *Immunity*. 14: 547-60.

Ford A. L., Goodsall A. L., Hickey W. F. and Sedgwick J. D. 1995. "Normal adult ramified microglia separated from other central nervous system macrophages by flow cytometric sorting. Phenotypic differences defined and direct ex vivo antigen presentation to myelin basic protein- reactive CD4+ T cells compared." *J Immunol*. 154: 4309-21.

Ford M. L. and Evavold B. D. 2005. "Specificity, magnitude, and kinetics of MOG-specific CD8(+) T cell responses during experimental autoimmune encephalomyelitis." *European Journal of Immunology*. 35: 76-85.

Fournier S., Rathmell J. C., Goodnow C. C. and Allison J. P. 1997. "T cell-mediated elimination of B7.2 transgenic B cells." *Immunity*. 6: 327-39.

Freeman G. J., Borriello F., Hodes R. J., Reiser H., Gribben J. G., Ng J. W., Kim J., Goldberg J. M., Hathcock K., Laszlo G. and et al. 1993. "Murine B7-2, an alternative CTLA4 counter-receptor that costimulates T cell proliferation and interleukin 2 production." *J Exp Med*. 178: 2185-92.

Freeman G. J., Gray G. S., Gimmi C. D., Lombard D. B., Zhou L. J., White M., Fingerhuth J. D., Gribben J. G. and Nadler L. M. 1991. "Structure, expression, and T cell costimulatory activity of the murine homologue of the human B lymphocyte activation antigen B7." *J Exp Med*. 174: 625-31.

Fritz R. B., Wang X. D. and Zhao M. L. 2000. "Alterations in the spinal cord T cell repertoire during relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis." *Journal of Immunology*. 164: 6662-6668.

Fuller K. G., Olson J. K., Howard L. M., Croxford J. L. and Miller S. D. 2004. "Mouse models of multiple sclerosis: experimental autoimmune encephalomyelitis and Theiler's virus-induced demyelinating disease." *Methods Mol Med*. 102: 339-61.

Fung-Leung W. P., Kundig T. M., Zinkernagel R. M. and Mak T. W. 1991. "Immune response against lymphocytic choriomeningitis virus infection in mice without CD8 expression." *J Exp Med*. 174: 1425-9.

Furlan R., Brambilla E., Ruffini F., Poliani P. L., Bergami A., Marconi P. C., Franciotta D. M., Penna G., Comi G., Adorini L. and Martino G. 2001. "Intrathecal delivery of IFN-gamma protects C57BL/6 mice from chronic-progressive experimental autoimmune encephalomyelitis by increasing apoptosis of central nervous system-infiltrating lymphocytes." *J Immunol.* 167: 1821-9.

Furtado G. C., Olivares-Villagomez D., Curotto de Lafaille M. A., Wensky A. K., Latkowski J. A. and Lafaille J. J. 2001. "Regulatory T cells in spontaneous autoimmune encephalomyelitis." *Immunol Rev.* 182: 122-34.

Garza K. M., Chan S. M., Suri R., Nguyen L. T., Odermatt B., Schoenberger S. P. and Ohashi P. S. 2000. "Role of antigen-presenting cells in mediating tolerance and autoimmunity." *J Exp Med.* 191: 2021-7.

Gehrmann J. 1996. "Microglia: a sensor to threats in the nervous system?" *Res Virol.* 147: 79-88.

Genc K., Dona D. L. and Reder A. T. 1997. "Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy." *J Clin Invest.* 99: 2664-71.

Gilden D. H., Cole G. A. and Nathanson N. 1972. "Immunopathogenesis of acute central nervous system disease produced by lymphocytic choriomeningitis virus. II. Adoptive immunization of virus carriers." *J Exp Med.* 135: 874-89.

Gilgun-Sherki Y., Panet H., Holdengreber V., Mosberg-Galili R. and Offen D. 2003. "Axonal damage is reduced following glatiramer acetate treatment in C57/bl mice with chronic-induced experimental autoimmune encephalomyelitis." *Neurosci Res.* 47: 201-7.

Girvin A. M., Dal Canto M. C., Rhee L., Salomon B., Sharpe A., Bluestone J. A. and Miller S. D. 2000. "A critical role for B7/CD28 costimulation in experimental autoimmune encephalomyelitis: a comparative study using costimulatory molecule- deficient mice and monoclonal antibody blockade." *J Immunol.* 164: 136-43.

Giuliani F., Goodyer C. G., Antel J. P. and Yong V. W. 2003. "Vulnerability of human neurons to T cell-mediated cytotoxicity." *Journal of Immunology*. 171: 368-379.

Gooding L. R. and Edwards C. B. 1980. "H-2 antigen requirements in the in vitro induction of SV40-specific cytotoxic T lymphocytes." *Journal of Immunology*. 124: 1258-62.

Goverman J., Woods A., Larson L., Weiner L. P., Hood L. and Zaller D. M. 1993. "Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity." *Cell*. 72: 551-60.

Grakoui A., Bromley S. K., Sumen C., Davis M. M., Shaw A. S., Allen P. M. and Dustin M. L. 1999. "The immunological synapse: a molecular machine controlling T cell activation." *Science*. 285: 221-7.

Greter M., Heppner F. L., Lemos M. P., Odermatt B. M., Goebels N., Laufer T., Noelle R. J. and Becher B. 2005. "Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis." *Nat Med*. 11: 328-34.

Grusby M. J., Johnson R. S., Papaioannou V. E. and Glimcher L. H. 1991. "Depletion of CD4+ T cells in major histocompatibility complex class II-deficient mice." *Science*. 253: 1417-20.

Guerder S., Picarella D. E., Linsley P. S. and Flavell R. A. 1994. "Costimulator B7-1 confers antigen-presenting-cell function to parenchymal tissue and in conjunction with tumor necrosis factor alpha leads to autoimmunity in transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 5138-42.

Guermonprez P. "ER-phagosome fusion defines an MHC class I cross-presentation compartment in dendritic cells.[see comment]."

Guillemin G. J. and Brew B. J. 2004. "Microglia, macrophages, perivascular macrophages, and pericytes: a review of function and identification." *J Leukoc Biol*. 75: 388-97.

Hanahan D. 1998. "Peripheral-antigen-expressing cells in thymic medulla: factors in self-tolerance and autoimmunity." *Curr Opin Immunol.* 10: 656-62.

Hanly A. and Petito C. K. 1998. "HLA-DR-positive dendritic cells of the normal human choroid plexus: a potential reservoir of HIV in the central nervous system." *Hum Pathol.* 29: 88-93.

Harding F. A., McArthur J. G., Gross J. A., Raulat D. H. and Allison J. P. 1992. "CD28-mediated signalling co-stimulates murine T cells and prevents induction of anergy in T-cell clones." *Nature.* 356: 607-9.

Haring J. S., Pewe L. L. and Perlman S. 2002. "Bystander CD8 T cell-mediated demyelination after viral infection of the central nervous system." *J Immunol.* 169: 1550-5.

Harlan D. M., Hengartner H., Huang M. L., Kang Y. H., Abe R., Moreadith R. W., Pircher H., Gray G. S., Ohashi P. S., Freeman G. J. and et al. 1994. "Mice expressing both B7-1 and viral glycoprotein on pancreatic beta cells along with glycoprotein-specific transgenic T cells develop diabetes due to a breakdown of T-lymphocyte unresponsiveness." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 91: 3137-41.

Hathcock K. S., Laszlo G., Pucillo C., Linsley P. and Hodes R. J. 1994. "Comparative analysis of B7-1 and B7-2 costimulatory ligands: expression and function." *J Exp Med.* 180: 631-40.

Hauser S. L., Bhan A. K., Gilles F., Kemp M., Kerr C. and Weiner H. L. 1986. "Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions." *Ann Neurol.* 19: 578-87.

Heppner F. L., Greter M., Marino D., Falsig J., Raivich G., Hovelmeyer N., Waisman A., Rulicke T., Prinz M., Priller J., Becher B. and Aguzzi A. 2005. "Experimental autoimmune encephalomyelitis repressed by microglial paralysis." *Nat Med.* 11: 146-52. Epub 2005 Jan 23.

Hickey W. F. 2001. "Basic principles of immunological surveillance of the normal central nervous system." *Glia.* 36: 118-24.

Hickey W. F., Vass K. and Lassmann H. 1992. "Bone marrow-derived elements in the central nervous system: an immunohistochemical and ultrastructural survey of rat chimeras." *J Neuropathol Exp Neurol.* 51: 246-56.

Hoftberger R., Aboul-Enein F., Brueck W., Lucchinetti C., Rodriguez M., Schmidbauer M., Jellinger K. and Lassmann H. 2004. "Expression of Major Histocompatibility Complex Class I Molecules on the Different Cell Types in Multiple Sclerosis Lesions."

Hogquist K. A., Jameson S. C., Heath W. R., Howard J. L., Bevan M. J. and Carbone F. R. 1994. "T cell receptor antagonist peptides induce positive selection." *Cell.* 76: 17-27.

Honma K., Parker K. C., Becker K. G., McFarland H. F., Coligan J. E. and Biddison W. E. 1997. "Identification of an epitope derived from human proteolipid protein that can induce autoreactive CD8+ cytotoxic T lymphocytes restricted by HLA-A3: evidence for cross-reactivity with an environmental microorganism." *J Neuroimmunol.* 73: 7-14.

Hori S., Haury M., Coutinho A. and Demengeot J. 2002. "Specificity requirements for selection and effector functions of CD25+4+ regulatory T cells in anti-myelin basic protein T cell receptor transgenic mice." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99: 8213-8.

Horwitz M. S., Yanagi Y. and Oldstone M. B. 1994. "T-cell receptors from virus-specific cytotoxic T lymphocytes recognizing a single immunodominant nine-amino-acid viral epitope show marked diversity." *J Virol.* 68: 352-7.

Houtman J. J. and Fleming J. O. 1996. "Dissociation of demyelination and viral clearance in congenitally immunodeficient mice infected with murine coronavirus JHM." *J Neurovirol.* 2: 101-10.

Hu D., Ikizawa K., Lu L., Sanchirico M. E., Shinohara M. L. and Cantor H. 2004. "Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice." *Nat Immunol.* 5: 516-23.

Huang A. Y., Bruce A. T., Pardoll D. M. and Levitsky H. I. 1996. "In vivo cross-priming of MHC class I-restricted antigens requires the TAP transporter." *Immunity*. 4: 349-55.

Huitinga I., Ruuls S. R., Jung S., Van Rooijen N., Hartung H. P. and Dijkstra C. D. 1995. "Macrophages in T cell line-mediated, demyelinating, and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in Lewis rats." *Clin Exp Immunol*. 100: 344-51.

Huitinga I., van Rooijen N., de Groot C. J., Uitdehaag B. M. and Dijkstra C. D. 1990. "Suppression of experimental allergic encephalomyelitis in Lewis rats after elimination of macrophages." *J Exp Med*. 172: 1025-33.

Hultgren B., Huang X., Dybdal N. and Stewart T. A. 1996. "Genetic absence of gamma-interferon delays but does not prevent diabetes in NOD mice." *Diabetes*. 45: 812-7.

Huseby E. S., Liggitt D., Brabb T., Schnabel B., Ohlen C. and Goverman J. 2001. "A pathogenic role for myelin-specific cd8(+) t cells in a model for multiple sclerosis." *J Exp Med*. 194: 669-76.

Ikemizu S., Gilbert R. J., Fennelly J. A., Collins A. V., Harlos K., Jones E. Y., Stuart D. I. and Davis S. J. 2000. "Structure and dimerization of a soluble form of B7-1." *Immunity*. 12: 51-60.

Inaba K., Witmer-Pack M., Inaba M., Hathcock K. S., Sakuta H., Azuma M., Yagita H., Okumura K., Linsley P. S., Ikehara S., Muramatsu S., Hodes R. J. and Steinman R. M. 1994. "The tissue distribution of the B7-2 costimulator in mice: abundant expression on dendritic cells in situ and during maturation in vitro." *J Exp Med*. 180: 1849-60.

Ishikawa T., Kono D., Chung J., Fowler P., Theofilopoulos A., Kakumu S. and Chisari F. V. 1998. "Polyclonality and multispecificity of the CTL response to a single viral epitope." *J Immunol*. 161: 5842-50.

Issazadeh S., Navikas V., Schaub M., Sayegh M. and Khoury S. 1998. "Kinetics of expression of costimulatory molecules and their ligands in murine relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in vivo." *J Immunol*. 161: 1104-12.

Itoh Y. and Germain R. N. 1997. "Single cell analysis reveals regulated hierarchical T cell antigen receptor signaling thresholds and intraclonal heterogeneity for individual cytokine responses of CD4+ T cells." *J Exp Med.* 186: 757-66.

Jacobsen M., Cepok S., Quak E., Happel M., Gaber R., Ziegler A., Schock S., Oertel W. H., Sommer N. and Hemmer B. 2002. "Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients." *Brain.* 125: 538-50.

Jansen A., Homo-Delarche F., Hooijkaas H., Leenen P. J., Dardenne M. and Drexhage H. A. 1994. "Immunohistochemical characterization of monocytes-macrophages and dendritic cells involved in the initiation of the insulinitis and beta-cell destruction in NOD mice." *Diabetes.* 43: 667-75.

Janssen E. M., Lemmens E. E., Wolfe T., Christen U., von Herrath M. G. and Schoenberger S. P. 2003. "CD4(+) T cells are required for secondary expansion and memory in CD8(+) T lymphocytes." *Nature.* 421: 852-856.

Jiang H., Braunstein N. S., Yu B., Winchester R. and Chess L. 2001. "CD8+ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+ T cells in EAE mice." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98: 6301-6.

Jiang H., Curran S., Ruiz-Vazquez E., Liang B., Winchester R. and Chess L. 2003. "Regulatory CD8+ T cells fine-tune the myelin basic protein-reactive T cell receptor V beta repertoire during experimental autoimmune encephalomyelitis." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 8378-83.

Jiang H., Zhang S. I. and Pernis B. 1992. "Role of CD8+ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis." *Science.* 256: 1213-5.

Joly E., Mucke L. and Oldstone M. B. 1991. "Viral persistence in neurons explained by lack of major histocompatibility class I expression." *Science.* 253: 1283-5.

Juedes A. E. and Ruddle N. H. 2001. "Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol.* 166: 5168-75.

Jurewicz A., Biddison W. E. and Antel J. P. 1998. "MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes." *J Immunol.* 160: 3056-9.

Kagi D., Vignaux F., Ledermann B., Burki K., Depraetere V., Nagata S., Hengartner H. and Golstein P. 1994. "Fas and perforin pathways as major mechanisms of T cell-mediated cytotoxicity." *Science.* 265: 528-30.

Kalman B. and Lublin F. D. 1999. "The genetics of multiple sclerosis. A review." *Biomed Pharmacother.* 53: 358-70.

Kane L. P., Lin J. and Weiss A. 2002. "It's all Rel-ative: NF-kappaB and CD28 costimulation of T-cell activation." *Trends Immunol.* 23: 413-20.

Kang J. A., Mohindru M., Kang B. S., Park S. H. and Kim B. S. 2000. "Clonal expansion of infiltrating T cells in the spinal cords of SJL/J mice infected with Theiler's virus." *J Immunol.* 165: 583-90.

Kappler J. W., Roehm N. and Marrack P. 1987. "T cell tolerance by clonal elimination in the thymus." *Cell.* 49: 273-80.

Katz-Levy Y., Neville K. L., Girvin A. M., Vanderlugt C. L., Pope J. G., Tan L. J. and Miller S. D. 1999. "Endogenous presentation of self myelin epitopes by CNS-resident APCs in Theiler's virus-infected mice." *J Clin Invest.* 104: 599-610.

Katz-Levy Y., Neville K. L., Padilla J., Rahbe S., Begolka W. S., Girvin A. M., Olson J. K., Vanderlugt C. L. and Miller S. D. 2000. "Temporal development of autoreactive Th1 responses and endogenous presentation of self myelin epitopes by central nervous system-resident APCs in Theiler's virus-infected mice." *J Immunol.* 165: 5304-14.

Kaufman D. L., Clare-Salzler M., Tian J., Forsthuber T., Ting G. S., Robinson P., Atkinson M. A., Sercarz E. E., Tobin A. J. and Lehmann P. V. 1993.

"Spontaneous loss of T-cell tolerance to glutamic acid decarboxylase in murine insulin-dependent diabetes." *Nature*. 366: 69-72.

Kawakami N., Lassmann S., Li Z., Odoardi F., Ritter T., Ziemssen T., Klinkert W. E., Ellwart J. W., Bradl M., Krivacic K., Lassmann H., Ransohoff R. M., Volk H. D., Wekerle H., Linington C. and Flugel A. 2004. "The activation status of neuroantigen-specific T cells in the target organ determines the clinical outcome of autoimmune encephalomyelitis." *J Exp Med*. 199: 185-97.

Kearney E. R., Walunas T. L., Karr R. W., Morton P. A., Loh D. Y., Bluestone J. A. and Jenkins M. K. 1995. "Antigen-dependent clonal expansion of a trace population of antigen-specific CD4+ T cells in vivo is dependent on CD28 costimulation and inhibited by CTLA-4." *J Immunol*. 155: 1032-6.

Kemp R. A. and Ronchese F. 2001. "Tumor-specific Tc1, but not Tc2, cells deliver protective antitumor immunity." *J Immunol*. 167: 6497-502.

Khoury S. J., Akalin E., Chandraker A., Turka L. A., Linsley P. S., Sayegh M. H. and Hancock W. W. 1995. "CD28-B7 costimulatory blockade by CTLA4Ig prevents actively induced experimental autoimmune encephalomyelitis and inhibits Th1 but spares Th2 cytokines in the central nervous system." *J Immunol*. 155: 4521-4.

Khoury S. J., Gallon L., Verburg R. R., Chandraker A., Peach R., Linsley P. S., Turka L. A., Hancock W. W. and Sayegh M. H. 1996. "Ex vivo treatment of antigen-presenting cells with CTLA4Ig and encephalitogenic peptide prevents experimental autoimmune encephalomyelitis in the Lewis rat." *J Immunol*. 157: 3700-5.

Kim W. K., Alvarez X., Fisher J., Bronfin B., Westmoreland S., McLaurin J. and Williams K. 2006. "CD163 identifies perivascular macrophages in normal and viral encephalitic brains and potential precursors to perivascular macrophages in blood." *Am J Pathol*. 168: 822-34.

Klasen S., Pages F., Peyron J. F., Cantrell D. A. and Olive D. 1998. "Two distinct regions of the CD28 intracytoplasmic domain are involved in the tyrosine phosphorylation of Vav and GTPase activating protein-associated p62 protein." *Int Immunol*. 10: 481-9.

Koh D. R., Fung-Leung W. P., Ho A., Gray D., Acha-Orbea H. and Mak T. W. 1992. "Less mortality but more relapses in experimental allergic encephalomyelitis in CD8^{-/-} mice." *Science*. 256: 1210-3.

Kohm A. P., Carpentier P. A., Anger H. A. and Miller S. D. d. 2002. "Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol*. 169: 4712-6.

Kojima K., Wekerle H., Lassmann H., Berger T. and Linington C. 1997. "Induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4⁺ T cells specific for an astrocyte protein, S100 beta." *J Neural Transm Suppl*. 49: 43-51.

Krakowski M. and Owens T. 1996. "Interferon-gamma confers resistance to experimental allergic encephalomyelitis." *Eur J Immunol*. 26: 1641-6.

Krakowski M. L. and Owens T. 2000. "Naive T lymphocytes traffic to inflamed central nervous system, but require antigen recognition for activation." *Eur J Immunol*. 30: 1002-1009.

Kreutzberg G. W. 1996. "Microglia: a sensor for pathological events in the CNS." *Trends Neurosci*. 19: 312-8.

Krogsgaard M., Wucherpfennig K. W., Cännella B., Hansen B. E., Svejgaard A., Pyrdol J., Ditzel H., Raine C., Engberg J. and Fugger L. 2000. "Visualization of myelin basic protein (MBP) T cell epitopes in multiple sclerosis lesions using a monoclonal antibody specific for the human histocompatibility leukocyte antigen (HLA)-DR2-MBP 85-99 complex." *J Exp Med*. 191: 1395-412.

Krummel M. F. and Allison J. P. 1995. "CD28 and CTLA-4 have opposing effects on the response of T cells to stimulation." *J Exp Med*. 182: 459-65.

Kurts C., Heath W. R., Carbone F. R., Allison J., Miller J. F. and Kosaka H. 1996. "Constitutive class I-restricted exogenous presentation of self antigens in vivo." *Journal of Experimental Medicine*. 184: 923-30.

Langrish C. L., Chen Y., Blumenschein W. M., Mattson J., Basham B., Sedgwick J. D., McClanahan T., Kastelein R. A. and Cua D. J. 2005. "IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation." *J Exp Med.* 201: 233-40.

Lanzavecchia A. 1998. "Immunology - Licence to Kill." *Nature.* 393: 413-414.

Laplaud D. A., Ruiz C., Wiertlewski S., Brouard S., Berthelot L., Guillet M., Melchior B., Degauque N., Edan G., Brachet P., Damier P. and Soullillou J. P. 2004. "Blood T-cell receptor beta chain transcriptome in multiple sclerosis. Characterization of the T cells with altered CDR3 length distribution." *Brain.* 127: 981-95.

Lavi E., Gilden D. H., Wroblewska Z., Rorke L. B. and Weiss S. R. 1984. "Experimental demyelination produced by the A59 strain of mouse hepatitis virus." *Neurology.* 34: 597-603.

Leiter E. H., Christianson G. J., Serreze D. V., Ting A. T. and Worthen S. M. 1989. "MHC antigen induction by interferon gamma on cultured mouse pancreatic beta cells and macrophages. Genetic analysis of strain differences and discovery of an "occult" class I-like antigen in NOD/Lt mice." *J Exp Med.* 170: 1243-62.

Lenschow D. J., Su G. H., Zuckerman L. A., Nabavi N., Jellis C. L., Gray G. S., Miller J. and Bluestone J. A. 1993. "Expression and functional significance of an additional ligand for CTLA-4." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 90: 11054-8.

Lenschow D. J., Zeng Y., Hathcock K. S., Zuckerman L. A., Freeman G., Thistlethwaite J. R., Gray G. S., Hodes R. J. and Bluestone J. A. 1995. "Inhibition of transplant rejection following treatment with anti-B7-2 and anti-B7-1 antibodies." *Transplantation.* 60: 1171-8.

Li L., Sad S., Kagi D. and Mosmann T. R. 1997. "CD8Tc1 and Tc2 cells secrete distinct cytokine patterns in vitro and in vivo but induce similar inflammatory reactions." *J Immunol.* 158: 4152-61.

Lieberman S. M. and DiLorenzo T. P. 2003. "A comprehensive guide to antibody and T-cell responses in type 1 diabetes." *Tissue Antigens*. 62: 359-77.

Lin M. Y. and Welsh R. M. 1998. "Stability and diversity of T cell receptor repertoire usage during lymphocytic choriomeningitis virus infection of mice." *J Exp Med*. 188: 1993-2005.

Lindstein T., June C. H., Ledbetter J. A., Stella G. and Thompson C. B. 1989. "Regulation of lymphokine messenger RNA stability by a surface-mediated T cell activation pathway." *Science*. 244: 339-43.

Link J., Soderstrom M., Olsson T., Hojeborg B., Ljungdahl A. and Link H. 1994. "Increased transforming growth factor-beta, interleukin-4, and interferon-gamma in multiple sclerosis." *Ann Neurol*. 36: 379-86.

Linsley P. S., Greene J. L., Brady W., Bajorath J., Ledbetter J. A. and Peach R. 1994. "Human B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) bind with similar avidities but distinct kinetics to CD28 and CTLA-4 receptors." *Immunity*. 1: 793-801.

Liu Y. and Mullbacher A. 1989. "The generation and activation of memory class I MHC restricted cytotoxic T cell responses to influenza A virus in vivo do not require CD4+ T cells." *Immunol Cell Biol*. 67 (Pt 6): 413-20.

London C. A., Lodge M. P. and Abbas A. K. 2000. "Functional responses and costimulator dependence of memory CD4+ T cells." *J Immunol*. 164: 265-72.

Lucchinetti C., Bruck W., Parisi J., Scheithauer B., Rodriguez M. and Lassmann H. 2000. "Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination." *Ann Neurol*. 47: 707-17.

Ludewig B., Odermatt B., Landmann S., Hengartner H. and Zinkernagel R. M. 1998. "Dendritic cells induce autoimmune diabetes and maintain disease via de novo formation of local lymphoid tissue." *J Exp Med*. 188: 1493-501.

Lyons J. A., Zhao M. L. and Fritz R. B. 1999. "Pathogenesis of acute passive murine encephalomyelitis II. Th1 phenotype of the inducing population is not sufficient to cause disease." *J Neuroimmunol*. 93: 26-36.

- Mack C. L., Vanderlugt-Castaneda C. L., Neville K. L. and Miller S. D. 2003. "Microglia are activated to become competent antigen presenting and effector cells in the inflammatory environment of the Theiler's virus model of multiple sclerosis." *J Neuroimmunol.* 144: 68-79.
- Marrie R. A. 2004. "Environmental risk factors in multiple sclerosis aetiology." *Lancet Neurol.* 3: 709-18.
- Martin R., McFarland H. F. and McFarlin D. E. 1992. "Immunological aspects of demyelinating diseases." *Annu Rev Immunol.* 10: 153-87.
- Martino G., Poliani P. L., Furlan R., Marconi P., Glorioso J. C., Adorini L. and Comi G. 2000. "Cytokine therapy in immune-mediated demyelinating diseases of the central nervous system: a novel gene therapy approach." *J Neuroimmunol.* 107: 184-90.
- Matsumoto Y., Yoon W. K., Jee Y., Fujihara K., Misu T., Sato S., Nakashima I. and Itoyama Y. 2003. "Complementarity-determining region 3 spectratyping analysis of the TCR repertoire in multiple sclerosis." *Journal of Immunology.* 170: 4846-4853.
- Matus A. and Ackerman A. L. 2003. "Early phagosomes in dendritic cells form a cellular compartment sufficient for cross presentation of exogenous antigens." *Nature Neuroscience.* 6: 1194-200.
- Matyszak M. K. and Perry V. H. 1996. "The potential role of dendritic cells in immune-mediated inflammatory diseases in the central nervous system." *Neuroscience.* 74: 599-608.
- McGavern D. B. and Truong P. 2004. "Rebuilding an immune-mediated central nervous system disease: weighing the pathogenicity of antigen-specific versus bystander T cells." *J Immunol.* 173: 4779-90.
- McMahon E. J., Bailey S. L., Castaneda C. V., Waldner H. and Miller S. D. 2005. "Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis." *Nat Med.* 11: 335-9.

McMenamin P. G. 1999. "Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations." *J Comp Neurol.* 405: 553-62.

Medana I., Martinic M. A., Wekerle H. and Neumann H. 2001. "Transection of major histocompatibility complex class I-induced neurites by cytotoxic T lymphocytes." *Am J Pathol.* 159: 809-15.

Michel F., Attal-Bonnefoy G., Mangino G., Mise-Omata S. and Acuto O. 2001. "CD28 as a molecular amplifier extending TCR ligation and signaling capabilities." *Immunity.* 15: 935-45.

Michel F., Grimaud L., Tuosto L. and Acuto O. 1998. "Fyn and ZAP-70 are required for Vav phosphorylation in T cells stimulated by antigen-presenting cells." *J Biol Chem.* 273: 31932-8.

Michel F., Mangino G., Attal-Bonnefoy G., Tuosto L., Alcover A., Roumier A., Olive D. and Acuto O. 2000. "CD28 utilizes Vav-1 to enhance TCR-proximal signaling and NF-AT activation." *J Immunol.* 165: 3820-9.

Miller S. D., Vanderlugt C. L., Begolka W. S., Pao W., Yauch R. L., Neville K. L., Katz-Levy Y., Carrizosa A. and Kim B. S. 1997. "Persistent infection with Theiler's virus leads to CNS autoimmunity via epitope spreading." *Nat Med.* 3: 1133-6.

Mittrucker H. W., Kursar M., Kohler A., Hurwitz R. and Kaufmann S. H. 2001. "Role of CD28 for the generation and expansion of antigen-specific CD8(+) T lymphocytes during infection with *Listeria monocytogenes*." *J Immunol.* 167: 5620-7.

Montero E., Nussbaum G., Kaye J. F., Perez R., Lage A., Ben-Nun A. and Cohen I. R. 2004. "Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies." *J Autoimmun.* 23: 1-7.

Monteyne P., Guillaume B. and Sindic C. J. 1998. "B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), interleukin-12 and transforming growth factor- beta mRNA expression in CSF and peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients." *J Neuroimmunol.* 91: 198-203.

Morgan D. J., Kurts C., Kreuwel H. T., Holst K. L., Heath W. R. and Sherman L. A. 1999. "Ontogeny of T cell tolerance to peripherally expressed antigens." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America.* 96: 3854-8.

Mosmann T. R., Cherwinski H., Bond M. W., Giedlin M. A. and Coffman R. L. 1986. "Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins." *J Immunol.* 136: 2348-57.

Mottet C., Uhlig H. H. and Powrie F. 2003. "Cutting edge: cure of colitis by CD4+CD25+ regulatory T cells." *J Immunol.* 170: 3939-43.

Muhallab S., Lidman O., Weissert R., Olsson T. and Svenningsson A. 2001. "Intra-CNS activation by antigen-specific T lymphocytes in experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Neuroimmunol.* 113: 202-11.

Murray R. S., Brown B., Brian D. and Cabirac G. F. 1992. "Detection of coronavirus RNA and antigen in multiple sclerosis brain." *Ann Neurol.* 31: 525-33.

Musette P., Bureau J. F., Gachelin G., Kourilsky P. and Brahic M. 1995. "T lymphocyte repertoire in Theiler's virus encephalomyelitis: the nonspecific infiltration of the central nervous system of infected SJL/J mice is associated with a selective local T cell expansion." *Eur J Immunol.* 25: 1589-93.

Najafian N., Chitnis T., Salama A. D., Zhu B., Benou C., Yuan X., Clarkson M. R., Sayegh M. H. and Khoury S. J. 2003. "Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model." *J Clin Invest.* 112: 1037-48.

Nash A. A., Jayasuriya A., Phelan J., Cobbold S. P., Waldmann H. and Prospero T. 1987. "Different roles for L3T4+ and Lyt 2+ T cell subsets in the control of an acute herpes simplex virus infection of the skin and nervous system." *J Gen Virol.* 68 (Pt 3): 825-33.

Naumov Y. N., Hogan K. T., Naumova E. N., Pagel J. T. and Gorski J. 1998. "A class I MHC-restricted recall response to a viral peptide is highly polyclonal despite stringent CDR3 selection: implications for establishing memory T cell repertoires in "real-world" conditions." *J Immunol.* 160: 2842-52.

Nguyen V. T. and Benveniste E. N. 2000. "Involvement of STAT-1 and its family members in interferon-gamma induction of CD40 transcription in microglia/macrophages." *J Biol Chem.* 275: 23674-84.

Nimmerjahn A., Kirchhoff F. and Helmchen F. 2005. "Resting microglial cells are highly dynamic surveillants of brain parenchyma in vivo." *Science.* 308: 1314-8.

Noseworthy J. H., Lucchinetti C., Rodriguez M. and Weinshenker B. G. 2000. "Multiple sclerosis." *N Engl J Med.* 343: 938-52.

Ohashi P. S., Oehen S., Buerki K., Pircher H., Ohashi C. T., Odermatt B., Malissen B., Zinkernagel R. M. and Hengartner H. 1991. "Ablation of "tolerance" and induction of diabetes by virus infection in viral antigen transgenic mice." *Cell.* 65: 305-17.

Olerup O. and Hillert J. 1991. "HLA class II-associated genetic susceptibility in multiple sclerosis: a critical evaluation." *Tissue Antigens.* 38: 1-15.

Olitsky P. K. and Yager R. H. 1949. "Experimental Disseminated Encephalomyelitis in White Mice." *Journal of Experimental Medicine.* 90: 213-&.

Olivares-Villagomez D., Wensky A. K., Wang Y. and Lafaille J. J. 2000. "Repertoire requirements of CD4+ T cells that prevent spontaneous autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol.* 164: 5499-507.

Oliveira-dos-Santos A. J., Ho A., Tada Y., Lafaille J. J., Tonegawa S., Mak T. W. and Penninger J. M. 1999. "CD28 costimulation is crucial for the development of spontaneous autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol.* 162: 4490-5.

Olson J. K., Croxford J. L., Calenoff M. A., Dal Canto M. C. and Miller S. D. 2001. "A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis." *J Clin Invest.* 108: 311-8.

Olson J. K., Girvin A. M. and Miller S. D. 2001. "Direct activation of innate and antigen-presenting functions of microglia following infection with Theiler's virus." *J Virol.* 75: 9780-9.

Olson J. K. and Miller S. D. 2004. "Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs." *J Immunol.* 173: 3916-24.

Ott P. A., Dittrich M. T., Herzog B. A., Guerkov R., Gottlieb P. A., Putnam A. L., Durinovic-Bello I., Boehm B. O., Tary-Lehmann M. and Lehmann P. V. 2004. "T cells recognize multiple GAD65 and proinsulin epitopes in human type 1 diabetes, suggesting determinant spreading." *J Clin Immunol.* 24: 327-39.

Owens T. and Sriram S. 1995. "The immunology of multiple sclerosis and its animal model, experimental allergic encephalomyelitis." *Neurol Clin.* 13: 51-73.

Owens T., Tran E., Hassan-Zahraee M. and Krakowski M. 1998. "Immune cell entry to the CNS--a focus for immunoregulation of EAE." *Res Immunol.* 149: 781-9; discussion 844-6, 855-60.

Padgett B. L., Walker D. L., ZuRhein G. M., Eckroade R. J. and Dessel B. H. 1971. "Cultivation of papova-like virus from human brain with progressive multifocal leucoencephalopathy." *Lancet.* 1: 1257-60.

Panitch H. S., Hirsch R. L., Schindler J. and Johnson K. P. 1987. "Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system." *Neurology.* 37: 1097-102.

Pentcheva-Hoang T., Egen J. G., Wojnoonski K. and Allison J. P. 2004. "B7-1 and B7-2 selectively recruit CTLA-4 and CD28 to the immunological synapse." *Immunity.* 21: 401-13.

Perrin P. J., June C. H., Maldonado J. H., Ratts R. B. and Racke M. K. 1999. "Blockade of CD28 during in vitro activation of encephalitogenic T cells or after disease onset ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol.* 163: 1704-10.

Perry V. H., Newman T. A. and Cunningham C. 2003. "The impact of systemic infection on the progression of neurodegenerative disease." *Nat Rev Neurosci.* 4: 103-12.

Pfeifer J. D., Wick M. J., Roberts R. L., Findlay K., Normark S. J. and Harding C. V. 1993. "Phagocytic processing of bacterial antigens for class I MHC presentation to T cells." *Nature.* 361: 359-62.

Piccirillo C. A. and Shevach E. M. 2001. "Cutting edge: control of CD8+ T cell activation by CD4+CD25+ immunoregulatory cells." *J Immunol.* 167: 1137-40.

Pitt D., Werner P. and Raine C. S. 2000. "Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis." *Nat Med.* 6: 67-70.

Polfliet M. M., Zwijnenburg P. J., van Furth A. M., van der Poll T., Dopp E. A., Renardel de Lavalette C., van Kesteren-Hendrikx E. M., van Rooijen N., Dijkstra C. D. and van den Berg T. K. 2001. "Meningeal and perivascular macrophages of the central nervous system play a protective role during bacterial meningitis." *J Immunol.* 167: 4644-50.

Ponomarev E. D., Shriver L. P., Maresz K. and Dittel B. N. 2005. "Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity." *J Neurosci Res.* 81: 374-89.

Pooley J. L., Heath W. R. and Shortman K. 2001. "Cutting edge: intravenous soluble antigen is presented to CD4 T cells by CD8- dendritic cells, but cross-presented to CD8 T cells by CD8+ dendritic cells." *Journal of Immunology.* 166: 5327-30.

Prineas J. W. and Wright R. G. 1978. "Macrophages, lymphocytes, and plasma cells in the perivascular compartment in chronic multiple sclerosis." *Lab Invest.* 38: 409-21.

Quan D., Pelak V., Tanabe J., Durairaj V. and Kleinschmidt-Demasters B. K. 2005. "Spinal and cranial hypertrophic neuropathy in multiple sclerosis." *Muscle Nerve*. 31: 772-9.

Quinn D. G., Zajac A. J., Frelinger J. A. and Muller D. 1993. "Transfer of lymphocytic choriomeningitis disease in beta 2-microglobulin-deficient mice by CD4+ T cells." *Int Immunol*. 5: 1193-8.

Racke M. K., Scott D. E., Quigley L., Gray G. S., Abe R., June C. H. and Perrin P. J. 1995. "Distinct roles for B7-1 (CD-80) and B7-2 (CD-86) in the initiation of experimental allergic encephalomyelitis." *J Clin Invest*. 96: 2195-203.

Raivich G. and Banati R. 2004. "Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease." *Brain Res Brain Res Rev*. 46: 261-81.

Ramirez M. C. and Sigal L. J. 2002. "Macrophages and dendritic cells use the cytosolic pathway to rapidly cross-present antigen from live, vaccinia-infected cells." *Journal of Immunology*. 169: 6733-42.

Ridge J. P., Di Rosa F. and Matzinger P. 1998. "A conditioned dendritic cell can be a temporal bridge between a CD4+ T- helper and a T-killer cell." *Nature*. 393: 474-8.

Rincon M. and Flavell R. A. 1994. "AP-1 transcriptional activity requires both T-cell receptor-mediated and co-stimulatory signals in primary T lymphocytes." *Embo J*. 13: 4370-81.

Rivest S., Lacroix S., Vallieres L., Nadeau S., Zhang J. and Laflamme N. 2000. "How the blood talks to the brain parenchyma and the paraventricular nucleus of the hypothalamus during systemic inflammatory and infectious stimuli." *Proc. Soc. Exp. Biol. Med*. 223: 22-38.

Rowe W. P., Black P. H. and Levey R. H. 1963. "Protective Effect Of Neonatal Thymectomy On Mouse Lcm Infection." *Proc Soc Exp Biol Med*. 114: 248-51.

Rudd C. E. 1996. "Upstream-downstream: CD28 cosignaling pathways and T cell function." *Immunity*. 4: 527-34.

Sad S., Marcotte R. and Mosmann T. R. 1995. "Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines." *Immunity*. 2: 271-9.

Sallusto F. and Lanzavecchia A. 1994. "Efficient Presentation of Soluble Antigen By Cultured Human Dendritic Cells Is Maintained By Granulocyte Macrophage Colony-Stimulating Factor Plus Interleukin-4 and Downregulated By Tumor Necrosis Factor-Alpha." *Journal of Experimental Medicine*. 179: 1109-1118.

Salomon B. and Bluestone J. A. 2001. "Complexities of CD28/B7: CTLA-4 costimulatory pathways in autoimmunity and transplantation." *Annu Rev Immunol*. 19: 225-52.

Salomon B., Lenschow D. J., Rhee L., Ashourian N., Singh B., Sharpe A. and Bluestone J. A. 2000. "B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes." *Immunity*. 12: 431-40.

Samelson L. E. 2002. "Signal transduction mediated by the T cell antigen receptor: the role of adapter proteins." *Annu Rev Immunol*. 20: 371-94.

Schmidt S., Linington C., Zipp F., Sotgiu S., de Waal Malefyt R., Wekerle H. and Hohlfeld R. 1997. "Multiple sclerosis: comparison of the human T-cell response to S100 beta and myelin basic protein reveals parallels to rat experimental autoimmune panencephalitis." *Brain*. 120 (Pt 8): 1437-45.

Schoenberger S. P., Toes R. E., van der Voort E. I., Offringa R. and Melief C. J. 1998. "T-cell help for cytotoxic T lymphocytes is mediated by CD40-CD40L interactions." *Nature*. 393: 480-3.

Schwartz J. C., Zhang X., Fedorov A. A., Nathenson S. G. and Almo S. C. 2001. "Structural basis for co-stimulation by the human CTLA-4/B7-2 complex." *Nature*. 410: 604-8.

Schweitzer A. N. and Sharpe A. H. 1998. "Studies using antigen-presenting cells lacking expression of both B7-1 (CD80) and B7-2 (CD86) show distinct requirements for B7 molecules during priming versus restimulation of Th2 but not Th1 cytokine production." *J Immunol.* 161: 2762-71.

Sedgwick J. D., Schwender S., Imrich H., Dorries R., Butcher G. W. and ter Meulen V. 1991. "Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 88: 7438-42.

Sellebjerg F., Jensen J. and Ryder L. P. 1998. "Costimulatory CD80 (B7-1) and CD86 (B7-2) on cerebrospinal fluid cells in multiple sclerosis." *J Neuroimmunol.* 84: 179-87.

Serafini B., Columba-Cabezas S., Di Rosa F. and Aloisi F. 2000. "Intracerebral recruitment and maturation of dendritic cells in the onset and progression of experimental autoimmune encephalomyelitis." *Am J Pathol.* 157: 1991-2002.

Serot J. M., Foliguet B., Bene M. C. and Faure G. C. 1997. "Ultrastructural and immunohistological evidence for dendritic-like cells within human choroid plexus epithelium." *Neuroreport.* 8: 1995-8.

Serreze D. V., Post C. M., Chapman H. D., Johnson E. A., Lu B. and Rothman P. B. 2000. "Interferon-gamma receptor signaling is dispensable in the development of autoimmune type 1 diabetes in NOD mice." *Diabetes.* 49: 2007-11.

Shahinian A., Pfeffer K., Lee K. P., Kundig T. M., Kishihara K., Wakeham A., Kawai K., Ohashi P. S., Thompson C. B. and Mak T. W. 1993. "Differential T cell costimulatory requirements in CD28-deficient mice." *Science.* 261: 609-12.

Shanmugam A., Copie-Bergman C., Falissard B., Delrieu O., Jais J. P., Rebibo D., Bach J. F. and Tournier-Lasserre E. 1996. "TCR alpha gene usage for myelin basic protein recognition in healthy monozygous twins."

Shanmugam A., Copie-Bergman C., Hashim G., Rebibo D., Jais J. P., Bach J. F., Bach M. A. and Tournier-Lasserre E. 1994. "Healthy monozygous twins do not recognize identical T cell epitopes on the myelin basic protein autoantigen."

Shedlock D. J. and Shen H. 2003. "Requirement for CD4 T cell help in generating functional CD8 T cell memory." *Science*. 300: 337-339.

Shevach E. M. 2002. "CD4+ CD25+ suppressor T cells: more questions than answers." *Nat Rev Immunol*. 2: 389-400.

Sibley W. A., Bamford C. R. and Clark K. 1985. "Clinical viral infections and multiple sclerosis." *Lancet*. 1: 1313-5.

Sigal L. J. "Cytotoxic T-cell immunity to virus-infected non-haematopoietic cells requires presentation of exogenous antigen.[see comment]."

Skulina C., Schmidt S., Dornmair K., Babbe H., Roers A., Rajewsky K., Wekerle H., Hohlfeld R. and Goebels N. 2004. "Multiple sclerosis: Brain-infiltrating CD8(+) T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101: 2428-2433.

Skurkovich S., Boiko A., Beliaeva I., Buglak A., Alekseeva T., Smirnova N., Kulakova O., Tchechonin V., Gurova O., Deomina T., Favorova O. O., Skurkovic B. and Gusev E. 2001. "Randomized study of antibodies to IFN-gamma and TNF-alpha in secondary progressive multiple sclerosis." *Mult Scler*. 7: 277-84.

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

Sparwasser T., Vabulas R. M., Villmow B., Lipford G. B. and Wagner H. 2000. "Bacterial CpG-DNA activates dendritic cells in vivo: T helper cell-independent cytotoxic T cell responses to soluble proteins." *Eur J Immunol*. 30: 3591-7.

Spielman R. S. and Nathanson N. 1982. "The genetics of susceptibility to multiple sclerosis." *Epidemiol Rev*. 4: 45-65.

Sprent J. and Surh C. D. 2002. "T cell memory [Review]." *Annual Review of Immunology*. 20: 551-579.

Staerz U. D., Karasuyama H. and Garner A. M. 1987. "Cytotoxic T lymphocytes against a soluble protein." *Nature*. 329: 449-51.

Steinman R. M. 1991. "The dendritic cell system and its role in immunogenicity." *Annu Rev Immunol*. 9: 271-96.

Stewart J. N., Mounir S. and Talbot P. J. 1992. "Human coronavirus gene expression in the brains of multiple sclerosis patients." *Virology*. 191: 502-5.

Sun D., Whitaker J. N., Huang Z., Liu D., Coleclough C., Wekerle H. and Raine C. S. 2001. "Myelin antigen-specific CD8+ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice." *J Immunol*. 166: 7579-87.

Sun J. C. and Bevan M. J. 2003. "Defective CD8 T cell memory following acute infection without CD4 T cell help." *Science*. 300: 339-342.

Suter T., Malipiero U., Otten L., Ludewig B., Muelethaler-Mottet A., Mach B., Reith W. and Fontana A. 2000. "Dendritic cells and differential usage of the MHC class II transactivator promoters in the central nervous system in experimental autoimmune encephalitis." *Eur J Immunol*. 30: 794-802.

Svenningsson A., Dotevall L., Stemme S. and Andersen O. 1997. "Increased expression of B7-1 costimulatory molecule on cerebrospinal fluid cells of patients with multiple sclerosis and infectious central nervous system disease." *J Neuroimmunol*. 75: 59-68.

Takahashi T., Kuniyasu Y., Toda M., Sakaguchi N., Itoh M., Iwata M., Shimizu J. and Sakaguchi S. 1998. "Immunologic self-tolerance maintained by CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells: induction of autoimmune disease by breaking their anergic/suppressive state." *Int Immunol*. 10: 1969-80.

Takeda K., Kaisho T. and Akira S. 2003. "Toll-like receptors." *Annu Rev Immunol*. 21: 335-76.

Tan L., Gordon K. B., Mueller J. P., Matis L. A. and Miller S. D. 1998. "Presentation of proteolipid protein epitopes and B7-1-dependent activation of

encephalitogenic T cells by IFN-gamma-activated SJL/J astrocytes." *J Immunol.* 160: 4271-9.

Tang Q., Henriksen K. J., Bi M., Finger E. B., Szot G., Ye J., Masteller E. L., McDevitt H., Bonyhadi M. and Bluestone J. A. 2004. "In vitro-expanded antigen-specific regulatory T cells suppress autoimmune diabetes." *J Exp Med.* 199: 1455-65.

Tarbell K. V., Yamazaki S., Olson K., Toy P. and Steinman R. M. 2004. "CD25+ CD4+ T cells, expanded with dendritic cells presenting a single autoantigenic peptide, suppress autoimmune diabetes." *J Exp Med.* 199: 1467-77.

Taylor P. A., Lees C. J., Fournier S., Allison J. P., Sharpe A. H. and Blazar B. R. 2004. "B7 expression on T cells down-regulates immune responses through CTLA-4 ligation via T-T interactions [corrections]." *J Immunol.* 172: 34-9.

Thomas H. E., Parker J. L., Schreiber R. D. and Kay T. W. 1998. "IFN-gamma action on pancreatic beta cells causes class I MHC upregulation but not diabetes." *J Clin Invest.* 102: 1249-57.

Thomas R. and Lipsky P. E. 1996. "Presentation of self peptides by dendritic cells: possible implications for the pathogenesis of rheumatoid arthritis." *Arthritis Rheum.* 39: 183-90.

Thompson C. B., Lindsten T., Ledbetter J. A., Kunkel S. L., Young H. A., Emerson S. G., Leiden J. M. and June C. H. 1989. "CD28 activation pathway regulates the production of multiple T-cell-derived lymphokines/cytokines." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 86: 1333-7.

Thornton A. M. and Shevach E. M. 2000. "Suppressor effector function of CD4+CD25+ immunoregulatory T cells is antigen nonspecific." *J Immunol.* 164: 183-90.

Tisch R., Yang X. D., Singer S. M., Liblau R. S., Fugger L. and McDevitt H. O. 1993. "Immune response to glutamic acid decarboxylase correlates with insulinitis in non-obese diabetic mice." *Nature.* 366: 72-5.

Tivol E. A., Borriello F., Schweitzer A. N., Lynch W. P., Bluestone J. A. and Sharpe A. H. 1995. "Loss of CTLA-4 leads to massive lymphoproliferation and fatal multiorgan tissue destruction, revealing a critical negative regulatory role of CTLA-4." *Immunity*. 3: 541-7.

Tompkins S. M., Padilla J., Dal Canto M. C., Ting J. P., Van Kaer L. and Miller S. D. 2002. "De novo central nervous system processing of myelin antigen is required for the initiation of experimental autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol*. 168: 4173-83.

Tran E. H., Hoekstra K., van Rooijen N., Dijkstra C. D. and Owens T. 1998. "Immune invasion of the central nervous system parenchyma and experimental allergic encephalomyelitis, but not leukocyte extravasation from blood, are prevented in macrophage-depleted mice." *J Immunol*. 161: 3767-75.

Tran E. H., Prince E. N. and Owens T. 2000. "IFN-gamma shapes immune invasion of the central nervous system via regulation of chemokines." *J. Immunol*. 164: 2759-68.

Traugott U., Reinherz E. L. and Raine C. S. 1983. "Multiple sclerosis: distribution of T cell subsets within active chronic lesions." *Science*. 219: 308-10.

Tsuhida T., Parker K. C., Turner R. V., McFarland H. F., Coligan J. E. and Biddison W. E. 1994. "Autoreactive CD8+ T-cell responses to human myelin protein-derived peptides." *Proc Natl Acad Sci U S A*. 91: 10859-63.

Utz U., Brooks J. A., McFarland H. F., Martin R. and Biddison W. E. 1994. "Heterogeneity of T-Cell Receptor Alpha-Chain Complementarity-Determining Region 3 in Myelin Basic Protein-Specific T Cells Increases With Severity of Multiple Sclerosis." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 91: 5567-5571.

Valenzuela J., Schmidt C. and Mescher M. 2002. "The roles of IL-12 in providing a third signal for clonal expansion of naive CD8 T cells." *Journal of Immunology*. 169: 6842-6849.

Van Parijs L., Sethna M. P., Schweitzer A. N., Borriello F., Sharpe A. H. and Abbas A. K. 1997. "Functional consequences of dysregulated B7-1 (CD80) and

B7-2 (CD86) expression in B or T lymphocytes of transgenic mice." *J Immunol.* 159: 5336-44.

Vanderlugt C. L. and Miller S. D. 2002. "Epitope spreading in immune-mediated diseases: implications for immunotherapy." *Nat Rev Immunol.* 2: 85-95.

Vass K. and Lassmann H. 1990. "Intrathecal application of interferon gamma. Progressive appearance of MHC antigens within the rat nervous system." *Am. J. Pathol.* 137: 789-800.

Viola A. and Lanzavecchia A. 1996. "T cell activation determined by T cell receptor number and tunable thresholds." *Science.* 273: 104-6.

Walunas T. L., Lenschow D. J., Bakker C. Y., Linsley P. S., Freeman G. J., Green J. M., Thompson C. B. and Bluestone J. A. 1994. "CTLA-4 can function as a negative regulator of T cell activation." *Immunity.* 1: 405-13.

Wang B., Andre I., Gonzalez A., Katz J. D., Aguet M., Benoist C. and Mathis D. 1997. "Interferon-gamma impacts at multiple points during the progression of autoimmune diabetes." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 13844-9.

Wang B., Gonzalez A., Benoist C. and Mathis D. 1996. "The role of CD8+ T cells in the initiation of insulin-dependent diabetes mellitus." *Eur J Immunol.* 26: 1762-9.

Ward S. G. 1996. "CD28: a signalling perspective." *Biochem J.* 318 (Pt 2): 361-77.

Werner P., Pitt D. and Raine C. S. 2000. "Glutamate excitotoxicity--a mechanism for axonal damage and oligodendrocyte death in Multiple Sclerosis?" *J Neural Transm Suppl.* 375-85.

Wicker L. S., Miller B. J. and Mullen Y. 1986. "Transfer of autoimmune diabetes mellitus with splenocytes from nonobese diabetic (NOD) mice." *Diabetes.* 35: 855-60.

Willenborg D. O., Fordham S., Bernard C. C., Cowden W. B. and Ramshaw I. A. 1996. "IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis." *J Immunol.* 157: 3223-7.

Willenborg D. O., Fordham S. A., Staykova M. A., Ramshaw I. A. and Cowden W. B. 1999. "IFN-gamma is critical to the control of murine autoimmune encephalomyelitis and regulates both in the periphery and in the target tissue: a possible role for nitric oxide." *J Immunol.* 163: 5278-86.

Willer C. J., Dymont D. A., Risch N. J., Sadovnick A. D. and Ebers G. C. 2003. "Twin concordance and sibling recurrence rates in multiple sclerosis." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 100: 12877-82.

Windhagen A., Newcombe J., Dangond F., Strand C., Woodroffe M. N., Cuzner M. L. and Hafler D. A. 1995. "Expression of costimulatory molecules B7-1 (CD80), B7-2 (CD86), and interleukin 12 cytokine in multiple sclerosis lesions." *J Exp Med.* 182: 1985-96.

Wong F. S., Visintin I., Wen L., Flavell R. A. and Janeway C. A., Jr. 1996. "CD8 T cell clones from young nonobese diabetic (NOD) islets can transfer rapid onset of diabetes in NOD mice in the absence of CD4 cells." *J Exp Med.* 183: 67-76.

Wong S., Guerder S., Visintin I., Reich E. P., Swenson K. E., Flavell R. A. and Janeway C. A., Jr. 1995. "Expression of the co-stimulator molecule B7-1 in pancreatic beta-cells accelerates diabetes in the NOD mouse." *Diabetes.* 44: 326-9.

Wu G. F., Dandekar A. A., Pewe L. and Perlman S. 2000. "CD4 and CD8 T cells have redundant but not identical roles in virus-induced demyelination." *J Immunol.* 165: 2278-86.

Wu G. F. and Perlman S. 1999. "Macrophage infiltration, but not apoptosis, is correlated with immune-mediated demyelination following murine infection with a neurotropic coronavirus." *J Virol.* 73: 8771-80.

Yu P., Gregg R. K., Bell J. J., Ellis J. S., Divekar R., Lee H. H., Jain R., Waldner H., Hardaway J. C., Collins M., Kuchroo V. K. and Zaghoulani H. 2005. "Specific

T regulatory cells display broad suppressive functions against experimental allergic encephalomyelitis upon activation with cognate antigen." *J Immunol.* 174: 6772-80.

Yu X., Fournier S., Allison J. P., Sharpe A. H. and Hodes R. J. 2000. "The role of B7 costimulation in CD4/CD8 T cell homeostasis." *J Immunol.* 164: 3543-53.

Zehntner S. P., Brickman C., Bourbonniere L., Remington L., Caruso M. and Owens T. 2005. "Neutrophils that infiltrate the central nervous system regulate T cell responses." *J Immunol.* 174: 5124-31.

Zehntner S. P., Brisebois M., Tran E., Owens T. and Fournier S. 2003. "Constitutive expression of a costimulatory ligand on antigen-presenting cells in the nervous system drives demyelinating disease." *FASEB Journal.* 17: NIL_151-NIL_171.

Zhang Y. and Allison J. P. 1997. "Interaction of CTLA-4 with AP50, a clathrin-coated pit adaptor protein." *Proc Natl Acad Sci U S A.* 94: 9273-8.