

Université de Montréal

**Rôle du NKG2D et ses ligands dans un modèle murin de la
sclérose en plaques**

par Laurine Legroux

Département de Neurosciences

Faculté de médecine

Thèse présentée à la Faculté des Etudes Supérieures en vue de l'obtention du grade de
Philosophiae doctor (PhD) en neurosciences

Août 2018

© Laurine Legroux, 2018

Résumé

La sclérose en plaques (SEP) est considérée comme la maladie inflammatoire prototypique du système nerveux central (SNC). Les lésions des patients atteints de la SEP sont caractérisées par une destruction de la gaine de myéline, des dommages axonaux et neuronaux et une activation des cellules gliales. Il est bien établi que le système immunitaire (SI) participe à la pathogénèse de la SEP. Néanmoins, la contribution des médiateurs immunitaires spécifiques aux insultes reste à définir.

Le NKG2D est un récepteur activateur exprimé par de multiples cellules immunitaires effectrices incluant des sous populations des lymphocytes T (LT) CD4 et CD8. Le NKG2D se lie à plusieurs ligands (NKG2DL) comprenant Rae-1 (alpha à epsilon), MULT1 et H60 (a à c) chez la souris. Les NKG2DL sont induits par des déclencheurs environnementaux (ex : inflammation) et alertent le SI de la présence de cellules anormales. Notre laboratoire a préalablement montré que des oligodendrocytes humains expriment au moins un NKG2DL dans les lésions de SEP mais pas dans les cerveaux témoins. De plus, les LT CD8 dans les lésions de SEP sont détectés à proximité des cellules exprimant les NKG2DL. Nous avons aussi établi qu'empêcher l'interaction entre le NKG2D et ses ligands inhibe la mort des oligodendrocytes humains par les cellules immunitaires effectrices activées, in vitro. Un autre groupe a montré que bloquer le NKG2D diminue la sévérité de la maladie dans un modèle murin de la SEP: l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). L'ensemble de ces résultats suggère que l'interaction NKG2D-NKG2DL peut contribuer à la pathogénèse de la SEP et de l'EAE. Cependant, il n'est pas encore établi, si des NKG2DL spécifiques sont augmentés in vivo pendant le développement de l'EAE et pourraient devenir une cible thérapeutique.

Nous avons utilisé l'EAE pour évaluer l'expression des NKG2DL aux différents stades du développement de l'EAE et étudier la contribution de NKG2D. Nous avons utilisé la cytométrie en flux, la qRT-PCR, de l'immunobuvardage de type western et l'ELISA.

Nous avons observé que le MULT1, un ligand spécifique du NKG2D, était augmenté dans le SNC des souris EAE et que cette expression élevée corrélait avec la sévérité de la

maladie. De plus, MULT1 était relâché dans le liquide cérébro-spinal (LCS) pendant l'EAE et la forme soluble du MULT1 avait augmenté les propriétés effectrices des cellules immunitaires. Au contraire, l'expression des autres ligands n'avait pas varié au cours de la maladie. Finalement, le transfert de cellules T auto-immunes activées dans des souris receveuses déficientes pour le NKG2D avait induit une maladie significativement moins sévère que lorsque ces cellules avaient été transférées à des souris sauvages. La proportion de cellules ayant infiltré le SNC corrélait avec la sévérité de la maladie. Nos résultats suggèrent que le NKG2D et un de ses ligands MULT1 participent à la pathogenèse de l'EAE et potentiellement de la SEP.

Mots-clés : Sclérose en plaques, EAE, NKG2D, MULT1, cytométrie en flux

Abstract

Multiple sclerosis (MS) is considered the prototypic inflammatory disease of the central nervous system (CNS). Lesions in the CNS of MS patients are characterized by myelin sheath destruction, oligodendrocyte death, axonal and neuronal damage, and activation of glial cells. It is well established that the immune system (IS) participates in the pathogenesis of MS. Nevertheless, the contribution of specific immune mediators to injury remains to be defined.

NKG2D is an activating receptor expressed by numerous immune effector cells including subsets of CD8 and CD4 T lymphocytes. NKG2D binds to various ligands (NKG2DL), which include Rae-1(alpha to epsilon), MULT1, and H60 (a to c) in mice. NKG2DL are induced by environmental triggers (e.g. inflammation) suggesting that these proteins alert the IS to abnormal cells. Our laboratory has previously shown that human oligodendrocytes express at least one NKG2DL in MS lesions but not in control brains. Moreover, CD8 T cells in MS lesions are detected in close proximity to NKG2DL expressing cells. We have also established that disruption of the NKG2D-NKG2DL interaction inhibits killing of human oligodendrocytes by activated immune effector cells in vitro. One group showed that blockade of NKG2D diminished disease severity in the MS mouse model: experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). Overall, these results imply that the NKG2D-NKG2DL interaction can contribute to the pathogenesis of MS and its animal model EAE. However, whether specific NKG2DL are upregulated in vivo during the development of EAE and could potentially be targeted is still unresolved.

We used EAE models, to assess the expression of NKG2DL during different disease stages and to study NKG2D contribution. We used flow cytometry, qRT-PCR, western blot and ELISA approaches.

We observed that MULT1, one specific ligand of NKG2D, is upregulated in the CNS of EAE mice and such elevated expression correlated with disease severity. Moreover, MULT1 was released in the cerebrospinal fluid during EAE and soluble MULT1 increased the effector properties of immune cells. In contrast, expression of other ligands did not vary throughout disease. Finally, adoptive transferred of activated autoimmune T cells into NKG2D

deficient recipient mice induced a significantly less severe disease than the transfer into wild type counterparts. The proportion of infiltrated cells in the CNS correlated with disease severity. Our results suggest that NKG2D and specific ligands could play a role in the pathogenesis of EAE and potentially MS.

Keywords: Multiple sclerosis, EAE, NKG2D, MULT1, flow cytometry

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	iii
Table des matières.....	v
Liste des tableaux.....	viii
Liste des figures	ix
Liste des abréviations.....	xi
Remerciements.....	xv
Chapitre 1 : Introduction.....	1
1.0 Le système nerveux.....	2
1.1 Les neurones	3
1.2 Les oligodendrocytes	5
1.3 Les astrocytes.....	7
1.4 Les microglies.....	9
1.5 La barrière hémato-encéphalique.....	12
1.6 Systèmes lymphatiques cérébraux	13
2.0 Le système immunitaire.....	14
2.1 Le système immunitaire inné.....	15
<u>2.1.1 Les cellules présentatrices d'antigène.....</u>	16
<u>2.1.2 Les NK, NKT, LT $\gamma\delta$</u>	17
2.2 Le système immunitaire adaptatif.....	19
<u>2.2.1 Les lymphocytes T.....</u>	20
<u>2.2.2 Les lymphocytes B.....</u>	22
<u>2.2.3 Mécanismes de tolérance et maladies auto-immunes</u>	23
3.0 La famille NKG2	26
3.1 Le récepteur NKG2D.....	27

3.2 Les ligands de NKG2D.....	31
3.4 Dérégulation de la voie NKG2D-NKG2DL	35
<u>3.3.1 Virus et cancer</u>	36
<u>3.3.2 Maladies auto-immunes et inflammatoires</u>	37
3.5 NKG2D et ses ligands dans le SNC.....	39
<u>3.4.1 Sclérose en plaques et EAE</u>	39
4.0 La sclérose en plaques	41
4.1 Prévalence	41
4.2 Symptômes.....	42
4.3 Caractéristiques anatomopathologiques.....	44
4.4 Diagnostic	45
4.5 Traitements	46
4.6 Modèles animaux	47
<u>4.6.1 Encephalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE)</u>	47
<u>4.6.2 Toxines</u>	50
<u>4.6.3 Virus</u>	51
4.7 Revue: “Multiple sclerosis and T lymphocytes: an entangled story”	51
5.0 Hypothèses et objectifs	101
<u>Article 1</u> : An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytometry	104
<u>Article 2</u> : NKG2D and its ligand MULT1 contribute to disease progression in a mouse model of multiple sclerosis	136
Chapitre 3 : Discussion/Conclusion.....	177
1.0 Article 1: An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytométrie.....	179
2.0 Article 2: NKG2D and its ligand MULT1 contribute to disease progression in a mouse model of multiple sclerosis	181
2.1 Rôle de NKG2D.....	182
2.2 Les ligands de NKG2D.....	186
<u>2.2.1 Forme entière de MULT1</u>	186

<u>2.2.2</u> <u>Forme soluble de MULT1</u>	188
<u>2.2.3</u> <u>Rôle de MULT1 et perspectives</u>	191
2.3 Implication de NKG2D et ses ligands dans la SEP et traitement	195
Bibliographie.....	199

Liste des tableaux

Table 1: Solutions used to process CNS tissues and cells..... 125

Table 2: Antibodies used for flow cytometry analysis..... 128

Liste des figures

Figure 1 : Cellules du système nerveux central	3
Figure 2 : Cellules du système immunitaire.....	15
Figure 3 : Le récepteur NKG2D chez la souris.....	29
Figure 4 : Les ligands de NKG2D	33
Figure 5 : NKG2D et ses ligands	35
Figure 6 : Les symptômes de la sclérose en plaques.....	43
Figure 7 : Les différentes formes de la sclérose en plaques.....	44
Figure 8 : Les différents stades de l'EAE	48
Figure 1 de la revue : Activation and roles of T lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE.....	81
Figure 1 de l'article 1 : Optimization of the Percoll™ step for the simultaneous isolation of neural cells and leukocytes from adult mouse brain and spinal cord.	129
Figure 2 de l'article 1 : Collagenase D+DNase I digestion increases the recovery of neural cells.	131
Figure 3 de l'article 1 : Collagenase D+DNase I digestion improves the recovery of hematopoietic cells.....	133
Figure 4 de l'article 1 : More leukocytes are isolated from the CNS of EAE mice compared to naïve animals.	134
Figure 1 de l'article 2 : Active EAE disease course is similar in the absence of NKG2D... ..	160
Figure 2 de l'article 2 : Variations in CNS expression of Rae-1 only at the mRNA level... ..	162
Figure 3 de l'article 2 : Upregulation of MULT1 at the mRNA and protein levels in the CNS during EAE	164
Figure 4 de l'article 2 : Increased levels of soluble MULT1 in the CSF during EAE.....	166
Figure 5 de l'article 2 : Soluble MULT1 augments effector functions of CD8 T lymphocytes	167
Figure 6 de l'article 2 : Passive EAE is less severe in Klrk1-/- than in wild type recipients	169
Figure 7 de l'article 2 : CNS-infiltrated endogenous CD8 lymphocytes exhibit effector functions.....	171

Figure 9 : Dots plot représentant les neurones (NeuN) et les astrocytes (ACSA2). 180

Figure 10 : MULT1 soluble augmente la sécrétion d'IFN γ 191

Figure 11 : Schéma illustrant l'implication potentielle de NKG2D et ses ligands dans la SEP
..... 198

Liste des abréviations

ADCC: *cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps*

AET: *active efflux transport*

BCR: *récepteur des lymphocytes B*

BDNF: *brain-derived neurotrophic factor*

BHE: *barrière hémato-encéphalique*

CD: *cellules dendritiques*

CD1d: *class I MHC-like molecule*

CMH: *complexe majeur d'histocompatibilité*

CMT: *carrier-mediated transport*

CLRs: *C-type lectin receptors*

CPA: *cellules présentatrices d'antigène*

CPO: *cellules précurseurs d'oligodendrocytes*

CSF-1: *colony stimulating factor 1*

CX3CR1: *CX3C chemokine receptor 1*

DAMPs: *damage associated molecular pattern*

EAA : *excitatory amino acid transporter*

EAE: *encéphalomyélite autoimmune expérimentale*

FGFβ: *fibroblast growth factor bêta*

GABA: *acide γ-aminobutyrique*

GAT: *GABA transporter*

GFAP: *glial fibrillary acidic protein*

GLUT: *glucose transporter*

H60: *histocompatibility 60*

HLA: *human leukocyte antigens*

IFN: *interféron*

IgG: *immunoglobulines de type G*

IL: *interleukines*

ITAM: *immunotyrosine-based activation motif*

JAM2: *junction adhesion molecule 2*

KAR: *killer activating receptors*
KIR: *killer-cell immunoglobulin-like receptor*
LB: *lymphocytes B*
LCS: *liquide cérébrospinale*
LPS: *lipopolysaccharide*
LT: *lymphocytes T*
MAG: *myelin-associated glycoprotein*
MBP: *myelin basic protein*
M-CSF: *macrophage-colony stimulating factor*
MIC: *non-conventional MHC class I chain-related*
MOG: *myelin oligodendrocyte glycoprotein*
MS: *multiple sclerosis*
MULT1: *murine UL-16-binding protein-like transcript 1*
NCAM: *neural cell adhesion molecule*
NGF: *nerve growth factor*
NLRs: *NOD-like receptors*
NK: *cellules tueuses naturelles*
NKG2D: *natural killer group 2*
NKG2DL: *ligands du NKG2D*
NKT: *cellules T tueuses*
NRG1: *neuregulin-1*
PA: *potentiel d'action*
PAMP: *pathogen associated molecular pattern*
PDGF α : *platelet-derived growth factor alpha*
PDGFR: *platelet-derived growth factor receptor*
PLP: *proteolipid protein*
PPSE: *potentiel post-synaptique excitateur*
PPSI: *potentiel post-synaptique inhibiteur*
PRR: *pattern recognition receptors*
Rae-1: *retinoic acid early inducible protein 1*
RE: *réticulum endoplasmique*

RLRs: *RIG-I-like receptors*
RMT: *receptor-mediated transport*
SEP: *sclérose en plaques*
SNC: *système nerveux central*
SNP: *système nerveux périphérique*
SI: *système immunitaire*
TCR: *récepteur des lymphocytes T*
TNF- α : *tumor necrosis factor alpha*
Treg: *LT régulateurs*
Tfh: *T follicular helper*
Th: *T helper*
ULBPs: *UL16-binding protein*

A mes deux amours

Remerciements

En premier lieu, je tiens à remercier la Dre Nathalie Arbour pour m'avoir fait confiance et prise dans son laboratoire pour effectuer ma thèse. Merci pour tout ce que tu m'as appris, d'avoir toujours laissé ta porte ouverte, d'avoir consacré du temps pour répondre à mes questions. Merci pour tes conseils avisés dans la mise en place de mes expériences et leur analyse. Ce fut enthousiasmant et enrichissant de travailler pour toi.

Je remercie tous les membres passés ou présents du laboratoire. Diane, merci pour ton aide précieuse. Mes journées au laboratoire n'auraient pas été les mêmes sans toi. Les membres de la première équipe : François, Vincent et Jonas. J'ai vraiment apprécié de venir travailler avec vous tous les jours. Les membres de la seconde équipe : Marie-Laure, Cyril, Negar, Ana, Gabrielle et Florent. Sans oublier les stagiaires que j'ai pu encadrer et qui ont chacun contribué à l'avancé de mon projet : Gabrielle, Sandrine, Chanel, Laurence et Laurent. Vous avez tous participé, d'une façon ou d'une autre à rendre ma thèse agréable.

Je remercie également les équipes des Dr Prat et Larochelle pour votre bonne humeur. Dominique de la plateforme de cytométrie et Aurélie de la plateforme de microscopie pour vos conseils. L'équipe du Dr Fernandez pour m'avoir donné accès à leur salle de chirurgie.

Plus personnellement, je tiens maintenant à remercier ma famille. Mes parents qui m'ont toujours soutenu et qui ont toujours cru en moi. Je n'en serais jamais arrivé là sans vous et je ne vous remercierai jamais assez. Mes sœurs: Judith, Estelle, Clara. Vous êtes les meilleurs et j'ai de la chance de vous avoir. Mon neveu et mes nièces : Léa, Lucas, Éloïse, Blanche et la petite en route. Vous être tous plus adorables les uns que les autres. Je vous aime tous et vous me manquez.

En dernier lieu, et pas des moindres, je remercie les deux amours de ma vie : Hugo, mon futur mari et mon petit trésor, Margot. Merci d'être vous. Hugo, il y a tellement de chose à dire. Merci d'être toujours présent, réconfortant, de me soutenir, m'écouter, me rassurer, me conseiller, me faire rire... Je n'aurais jamais réussi sans toi. Margot, tu nous apportes tellement de bonheur, tu es une petite fille formidable qui nous fait passer des rires aux larmes de joie. Tu es ma petite championne du monde toujours joyeuse. Tu as contribué, avec ton

beau sourire, à me donner l'énergie nécessaire à la rédaction de ma thèse. Je vous aime plus que tout et vous faites de moi une femme épanouie.

Chapitre 1 : Introduction

1.0 Le système nerveux

Le système nerveux est composé du système nerveux central (SNC) et du système nerveux périphérique (SNP). Le SNC est lui-même composé de l'encéphale, comprenant deux hémisphères cérébraux, du cervelet et du tronc cérébral ainsi que de la moelle épinière (fig. 1). Il est entouré de trois méninges : la dure mère, l'arachnoïde et la pie-mère puis respectivement du crâne ou des vertèbres (Ranck, 1975). Dans l'espace sous-arachnoïdien, les quatre ventricules cérébraux, le canal central de la moelle épinière et le cul de sac dural, circule le liquide cérébro-spinal (LCS). C'est un liquide biologique dont le volume chez l'humain est d'environ 140 ml renouvelé 3 à 4 fois par jour et résorbé au niveau des villosités arachnoïdiennes par le système veineux. Il a pour fonctions de protéger le SNC des chocs, de l'isoler électriquement, d'éliminer les déchets, et de transporter les différentes cellules et les protéines (Merril et al., 1981). En périphérie du cerveau, on retrouve le cortex cérébral constituant la matière grise où sont situés les corps cellulaires des neurones. En profondeur, la matière blanche contient les fibres nerveuses (axones et dendrites) ainsi que la myéline. De la matière grise est également retrouvée en profondeur du cerveau, il s'agit des noyaux gris centraux. A l'inverse du cerveau, dans la moelle épinière la matière blanche est en périphérie et la matière grise au centre (Gur et al., 1999). Le rôle du SNC est d'intégrer les informations venant de la périphérie et de fournir une réponse adéquate. Il est composé d'environ 10% de neurones et de trois types de cellules gliales principaux: les oligodendrocytes, les astrocytes et les microglies (fig. 1) (Sokoloff, 1977).

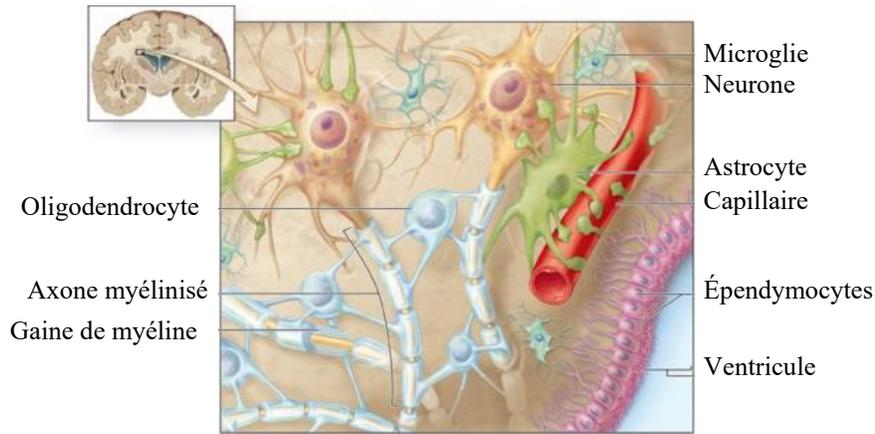


Figure 1 : Cellules du système nerveux central. Adapté de Anthony L. Mescher: Junqueira's Basic Histology, 14th Edition

1.1 Les neurones

Les neurones sont constitués d'un soma (corps cellulaire) et de neurites, appelés dendrites ou axones. Les dendrites sont des prolongements ramifiés qui reçoivent l'information nerveuse au niveau de terminaisons post-synaptiques alors que les axones transportent le message nerveux en périphérie et présentent à leurs extrémités une terminaison pré-synaptique (Palay and Palade, 1955). Les messages nerveux sont transmis sous forme de potentiels d'action (PA) caractérisés par trois étapes qui sont une dépolarisation neuronale suivie d'une repolarisation puis d'une hyper-polarisation. Le PA fonctionne de manière tout ou rien, il faut qu'une valeur de potentiel de dépolarisation seuil soit atteinte pour qu'il soit déclenché. Les PA étant tous identiques avec la même amplitude, les informations nerveuses sont codées en fréquence de PA (Bean, 2007). La communication entre neurones se fait principalement au moyen de synapses chimiques, faisant intervenir des neurotransmetteurs même s'il existe également des synapses électriques. La synthèse de neurotransmetteurs se fait aussi bien dans le corps cellulaire que dans l'axone, et ces derniers sont ensuite stockés dans les vésicules synaptiques. Lors de l'arrivée du PA, la dépolarisation de la terminaison pré-synaptique conduit à l'ouverture des canaux calciques voltages dépendants, provoquant une augmentation du calcium intracellulaire. Ceci entraîne la fusion des vésicules synaptiques remplies de neurotransmetteurs avec la membrane pré-synaptique. Les neurotransmetteurs sont ainsi libérés dans la fente synaptique par exocytose et se fixent sur les récepteurs présents sur la membrane post-synaptique (Yi and Ehlers, 2005).

Les neurotransmetteurs classiques sont l'acétylcholine, les acides aminés (glutamate, aspartate, acide γ -aminobutyrique (GABA), glycine), les catécholamines (dopamine, noradrénaline, adrénaline), l'indolamine (sérotonine) et l'imidazolamine (histamine) mais il existe également des neurotransmetteurs peptidiques. Les neurotransmetteurs en surplus sont diffusés et dégradés ou retournent dans la terminaison pré-synaptique grâce à des transporteurs. Il y a deux grandes catégories de récepteurs aux neurotransmetteurs, les récepteurs canaux ou ionotropiques et les récepteurs couplés aux protéines G ou métabotropiques (Hyman, 2005; Snyder, 2009). La liaison du neurotransmetteur sur son récepteur crée soit un potentiel post-synaptique excitateur (PPSE), principalement lorsque la synapse est située en partie distale des dendrites soit un potentiel post-synaptique inhibiteur (PPSI), principalement lorsque la synapse est située en partie proximale des dendrites ou au niveau du soma. Il faut que la somme des PPSE et PPSI dépasse le seuil de dépolarisation pour que le PA soit déclenché (Gardner and Kandel, 1972). En outre, on comptabilise 6 types neuronaux principaux caractérisés par la production d'un neurotransmetteur spécifique (Basar and Guntekin, 2008):

- Le glutamate qui correspond au neurotransmetteur excitateur le plus courant. Il est très important pour la plasticité synaptique et notamment pour les processus mémoire (« long term potentiation ») (Traynelis et al., 2010)
- Le GABA qui est le neurotransmetteur inhibiteur le plus commun (Hendry et al., 1989).
- L'acétylcholine qui est importante pour induire les mouvements des muscles par les neurones provenant de la moelle épinière mais qui intervient également dans certaines activités corticales comme la régulation de la mémoire (Descarries and Mechawar, 2000).
- La noradrénaline qui est un régulateur des activités neuronales, aussi bien excitatrice qu'inhibitrice, induites par les autres neurotransmetteurs. Au niveau du SNP, elle intervient dans les réponses aiguës au stress (Chamberlain et al., 2006).
- La dopamine qui intervient dans la régulation des mouvements mais aussi dans le système de récompense, de plaisir et les phénomènes d'attention (Chinta and Andersen, 2005).
- La sérotonine qui est responsable des perceptions sensorielles, de la modulation de l'humeur et de l'appétit. Dans la moelle épinière, elle inhibe la voie de la douleur (Jacobs and Azmitia, 1992).

1.2 Les oligodendrocytes

Les progéniteurs d'oligodendrocytes sont des cellules rondes et unipolaires. Il existe deux familles de cellules précurseurs d'oligodendrocytes (CPO), la majorité d'entre elles exprime le « platelet-derived growth factor receptor » (PDGFR) et est dépendante du « platelet-derived growth factor alpha » (PDGF α) pour leur survie et leur prolifération alors que d'autres sont indépendantes de la voie PDGFR-PDGF α (Tokumoto et al., 2001).

Dans le SNC, les prolongements des oligodendrocytes s'enroulent autour des axones des neurones et forment la gaine de myéline. Il existe aussi des axones non myélinisés dont la vitesse de conduction est liée au diamètre de l'axone puisque la propagation des PA se fait par courants locaux. Ainsi, plus ce diamètre est élevé, plus le flux est rapide (Nave and Werner, 2014). Les voies de signalisation entraînant la myélinisation de certains axones et pas d'autres ne sont pas encore totalement élucidées.

En général, un calibre minimum est requis (environ 1 μ m) pour qu'un axone soit myélinisé. On sait également que l'activité électrique des neurones ainsi que le microenvironnement axonal et la densité des CPO jouent un rôle important (Rosenberg, Kelland et al. 2008, Baraban, Mensch et al. 2016, (Sherman and Brophy, 2005). De plus, d'autres études ont, par exemple, montré que l'acide polysialiné de la « neural cell adhesion molecule » (NCAM) n'est plus exprimé au moment de la myélinisation, que la « neuregulin-1 » (NRG1) promeut la myélinisation ou que la « nerve growth factor » (NGF) a un rôle régulateur sur cette dernière (Chan et al., 2004; Charles et al., 2000; Taveggia et al., 2008). En outre, il existe des protéines inhibitrices (« junction adhesion molecule 2 » (JAM2)) au niveau du soma et des dendrites expliquant que seuls les axones soient myélinisés (Redmond et al., 2016).

On peut observer en microscopie électronique la composition de la gaine de myéline caractérisée par une alternance de lignes denses majeures et claires dites intrapériodiques. Les deux feuillettes internes de la bicouche lipidique forment la ligne dense majeure (il n'y a plus de cytoplasme entre les membranes internes) et les feuillettes externes les lignes intrapériodiques. La myéline est composée de 70% de lipides dont majoritairement du cholestérol mais aussi des galactosides céramides et des sulfatyls. Elle contient 30% de protéines dont 50% de « proteolipid protein » (PLP), 30% de « myelin basic protein » (MBP), 1% de « myelin-

associated glycoprotein » (MAG) et 0,1% de « myelin oligodendrocyte glycoprotein » (MOG) (Greer, 2013).

Un seul oligodendrocyte peut former la myéline de plus de 50 segments d'axones (Pfeiffer et al., 1993). La gaine de myéline est séparée au niveau de nœuds de Ranvier. Ce dernier est composé de trois zones : le nœud lui-même, la zone paranode de part et d'autre du nœud où il y a contact direct entre la gaine et la membrane axonale (interaction neurofascine/caspr-contactine) et la zone juxta-paranodale sans contact direct. La myéline permet une propagation saltatoire du PA avec des échanges ioniques conduisant à la dépolarisation neuronale seulement au niveau des nœuds de Ranvier où sont présents les canaux sodiques (Nave and Werner, 2014). Elle permet d'augmenter grandement la vitesse de l'influx nerveux, ceci est essentiel à la communication neuronale efficace et rapide dans l'espace condensé du SNC. Par exemple, pour un diamètre de 10 μ m la vitesse de conduction est d'environ 1m/s sans myéline, elle peut atteindre jusqu'à 100m/s avec myéline (Zalc et al., 2008).

La gaine de myéline est également primordiale pour la maturation des axones et leurs survies à long terme (Nave, 2010). Une perte de la gaine de myéline entraîne donc un ralentissement de l'influx nerveux voir un arrêt en plus d'exposer les axones à de potentielles sources de dommage. La myélinisation se déroule majoritairement pendant les premières années post-natales même si c'est un processus continu que l'on observe tout au long de la vie de l'individu. A l'âge adulte elle est essentielle au maintien des fonctions cognitives et à la plasticité. Les nouveaux oligodendrocytes remplacent des cellules mortes de façon physiologique et permettent de remodeler la myéline préexistante ou myéliniser des axones non-myélinisés préalablement. Les inter-noeuds formés sont plus courts et plus nombreux (Bartzokis et al., 2012; Fields, 2008; Hermoye et al., 2006; Young et al., 2013; Zatorre et al., 2012). Par conséquent, des CPO sont présentes chez l'adulte, leur morphologie est un peu différente mais ces cellules expriment les mêmes marqueurs que leur équivalent embryonnaire. Ce sont des cellules plus ou moins quiescentes qui représentent entre 5 et 10 % de toutes les cellules du SNC. En outre, les cellules souches adultes neurales peuvent aussi se différencier en oligodendrocyte et participer à la formation de la gaine de myéline. Ces deux types cellulaires sont capables de proliférer, migrer et de se différencier en oligodendrocyte myélinisant (Peru et al., 2008).

Un certain nombre de pathologies neurologiques mais aussi psychiatriques sont associées à une démyélinisation du SNC. De multiples causes ont été identifiées. Elles peuvent, par exemple, être génétiques (leucodystrophies), accidentelles (trauma spinal) ou encore liées à la neuroinflammation (SEP). Malheureusement, la re-myélinisation dans le contexte de ces pathologies permettant de préserver l'intégrité axonale et associée à la rémission des signes cliniques reste trop limitée (Davis et al., 2003; Gieselmann et al., 1994; Legroux and Arbour, 2015; Totoiu and Keirstead, 2005). Dans la SEP, l'échec de la re-myélinisation n'est pas dû à la rareté des cellules progénitrices mais à leur inefficacité à se différencier. Les raisons évoquées pouvant expliquer ceci, sont l'astrogliose ainsi que la présence de débris de myéline et de médiateurs de l'inflammation dans les lésions (Franklin, 2002; Kotter et al., 2006; Kuhlmann et al., 2008; Tanaka and Yoshida, 2014). Potentialiser les mécanismes de réparation de la myéline dans des contextes pathologiques représente un défi de taille pour les années à venir.

1.3 Les astrocytes

Les astrocytes tiennent leur nom de leur morphologie très étoilée avec de longs prolongements cytoplasmiques. Lors du développement, ces cellules participent au guidage axonal et sont essentielles pour mener les axones vers les bonnes cibles. Elles ont un rôle primordial à la synapse, on parle de synapse tripartite avec les pieds astrocytaires et les deux terminaisons synaptiques. Elles interviennent dans la formation des synapses avec la maturation des terminaisons pré et post synaptiques mais aussi dans la stabilisation ou l'élimination de ces dernières et dans la régulation de la force de la transmission synaptique. Les astrocytes sont donc primordiaux au développement, à la plasticité et à la fonction des synapses (Chung et al., 2015a). Ils peuvent également éviter l'excitotoxicité et les dommages qui en découlent en re-capturant le surplus de glutamate dans la fente synaptique ou au niveau de sites extrasynaptiques (Hamilton and Attwell, 2010).

Les neurones n'étant jamais en contact avec les vaisseaux sanguins, les astrocytes forment également un soutien trophique, antioxydant et métabolique important au bon fonctionnement de ces derniers. En effet ils stockent et délivrent du glucose aux neurones, leurs fournissent des facteurs de croissance et se débarrassent de leurs métabolites dans la circulation générale (Allaman et al., 2011). Ces cellules sont très riches en transporteurs

(ex : « Excitatory amino acid transporter » (EAAT), « glucose transporter » (GLUT), Na/K ATPase, « GABA transporter » (GAT)) et importantes pour le maintien de l'homéostasie en régulant par exemple l'osmolarité, le pH et la teneur en eau. Les astrocytes connectés les uns aux autres par des connexons (Gap junction) sont des cellules frontières entre différentes régions du SNC. On les retrouve notamment au niveau de la jonction LCS-parenchyme cérébral et au niveau de la « barrière hémato-encéphalique » (BHE). Ils participent au maintien de leur intégrité mais ils reçoivent également des informations (molécules présentes) venant des différents compartiments. Au niveau de la BHE, les astrocytes peuvent moduler le flux sanguin en libérant des molécules vasodilatatrices (prostaglandines, acides époxyeicosatriénoïques) ou vasoconstrictrices (acide 20-hydroxyeicosatétraénoïque) (MacVicar and Newman, 2015).

Alors que les astrocytes étaient vus comme un sous type cellulaire homogène, on sait maintenant que c'est une population complexe avec une diversité importante (Ben Haim and Rowitch, 2017; Khakh and Sofroniew, 2015). On observe des différences morphologiques et de profil moléculaire. Dans la matière blanche, les astrocytes sont de morphologie allongée, avec une forte expression de « glial fibrillary acidic protein » (GFAP) alors que dans la matière grise ils sont de morphologie radiale, avec une faible expression de GFAP. Les premiers s'appellent les astrocytes fibreux et forment des contacts avec les synapses et les vaisseaux sanguins. Les seconds s'appellent les astrocytes protoplasmiques et forment des contacts avec les oligodendrocytes et les axones myélinisés. Il existe 7 autres types d'astrocytes qui sont des cellules spécialisées comme les cellules gliales de Bergmann dans le cervelet, de Müller dans la rétine ou les cellules souches adultes neurales (cellules de type B). Ces dernières sont très plastiques et capables de répondre à certains facteurs environnementaux comme le niveau de stress ou la présence d'agents infectieux. Elles peuvent devenir des cellules gliales (ex : voie Notch, BMP) ou des neurones (ex : voie Wnt, antagoniste de BMP) en fonction du microenvironnement (types cellulaires présents, signaux cellulaires, matrice extracellulaire, microvasculature) (Salgado et al., 2015). Un changement du microenvironnement peut induire un changement de destin des cellules souches adultes neurales. En effet, par exemple, la démyélinisation peut induire l'augmentation de la chondrine dans la zone subventriculaire, où se trouvent ces cellules, et réorienter leur différenciation en oligodendrocytes à la place de neurones (Jablonska et al., 2010). On observe aussi des

différences fonctionnelles des astrocytes en fonction des zones du cerveau. Par exemple, une étude a montré que des cellules de type B étaient capables de se différencier en neurones quand elles étaient mises en co-culture avec des astrocytes venant de l'hippocampe mais pas quand elles étaient mises en co-culture avec des astrocytes venant de la moelle épinière (Song et al., 2002).

Les astrocytes sont capables de répondre à des situations pathologiques (ex : lésion, inflammation) par exemple en libérant des cytokines pro-inflammatoires, en répondant aux médiateurs de l'inflammation ou en participant à la cicatrisation. Le processus de cicatrisation s'appelle l'astrogliose et est caractérisé par une prolifération des astrocytes, une sécrétion de médiateurs de l'inflammation, un changement de phénotype, ainsi qu'une synthèse et une redistribution des protéines du cytosquelette. En outre, les gènes induits diffèrent suivant la pathologie. Par exemple, les astrocytes réactifs dans un modèle d'accident vasculaire cérébral ont un phénotype A2 protecteur (expression de facteurs neurotrophiques), alors que ceux dans un modèle de neuroinflammation induit par le LPS ont un phénotype A1 délétère, notamment sur les neurones voisins (expression des protéines du complément). Suite à un stimulus dans une même région, seuls certains sous types d'astrocytes deviennent réactifs (Zamanian et al., 2012). L'astrogliose est un mécanisme physiologique de protection du SNC qui permet de confiner les dommages à la région touchée, mais qui peut également être un obstacle à la repousse axonale et à la remyélinisation (Sofroniew, 2014). Des études récentes mettent en évidence que des dysfonctions des astrocytes peuvent aussi être à l'origine de dysfonctions neuronales et entraîner des symptômes neurologiques (Chung et al., 2015b; Tong et al., 2014).

1.4 Les microglies

Les microglies sont des cellules nerveuses d'origine extrinsèque mésodermique, contrairement aux autres cellules gliales et aux neurones. A partir du sac vitellin extra-embryonnaire, certains progéniteurs communs myéloïdes colonisent progressivement le SNC et se différencient en microglie. Après migration dans le parenchyme cérébral et différents stades de mitose, elles passent d'une forme amiboïde (gros corps cellulaire, peu de prolongement) à une forme ramifiée. Le récepteur « colony stimulating factor 1 » (CSF-1), le « macrophage-colony stimulating factor » (M-CSF) et « l'interleukine 34 » (IL-34) interviennent dans le

développement microglial en prévenant l'apoptose et en ayant un effet chimiotactique, mitogénique et morphogénique (élongation des processus cellulaires) (Erblich et al., 2011).

Les microglies sont retrouvées dans toutes les structures du SNC à un taux variant de 5 à 12% du nombre total de cellules neurales. Elles ont des formes spécifiques suivant leur localisation, par exemple dans le cortex cérébral elles présentent des ramifications tout autour du corps cellulaire alors que dans le corps calleux les ramifications sont polarisées et se retrouvent uniquement de chaque côté du corps cellulaire (Perry, 1994). Plus largement, le phénotype fonctionnel des microglies est régionalement hétérogène et lié au microenvironnement cérébral local. L'hétérogénéité se base principalement sur les fonctions immunorégulatrices et bio-énergétiques de ces cellules. Les fonctions des microglies striatales et corticales sont similaires et éloignées de celles des microglies du cervelet alors que les microglies hippocampales ont un phénotype intermédiaire. Les microglies du cervelet ont une expression des gènes associés aux réponses immunitaires et à la défense de l'organisme (ex : gènes du « complexe majeur d'histocompatibilité » (CMH) ou de la signalisation interféron) plus importante que dans les autres régions. Les microglies du cervelet et de l'hippocampe ont une plus grande expression des gènes associés au système de production d'énergie et de sa régulation (ex : gènes associés à la synthèse d'ATP ou à la glycolyse). On observe également une évolution différente des microglies avec l'âge suivant leur localisation. La distinction du phénotype des microglies du cervelet s'amplifie avec l'âge alors que celle des microglies de l'hippocampe diminue par rapport à celles du cortex et du stratum (Grabert et al., 2016).

L'apoptose est une forme fréquente de mort neuronale dans laquelle les microglies interviennent en répondant aux signaux « eat me » correspondant à l'externalisation de la phosphatidylsérine et en phagocytant les débris cellulaires. Ceci permet de prévenir la fuite des médiateurs cytotoxiques et pro-inflammatoires (Elliott et al., 2009). Les microglies participent également à la promotion de la mort de différents types de neurones au cours du développement (cellules de Purkinje, cellules rétinales, motoneurones) notamment via la signalisation du « tumor necrosis factor alpha » (TNF- α), du « nerve growth factor » (NGF) et la production d'ions superoxydes (Frade and Barde, 1998; Marin-Teva et al., 2004; Sedel et al., 2004).

Les microglies sont impliquées dans l'élagage synaptique via le CX3CR1, qui représente un processus essentiel au développement normal du SNC (Paolicelli et al., 2011). Ainsi elles entrent transitoirement en contact avec les épines synaptiques peu actives, pour potentiellement les phagocyter (Tremblay et al., 2010; Wake et al., 2009). Les microglies jouent aussi un rôle dans la plasticité synaptique chez l'adulte. En effet, leur élimination conduit à des troubles d'apprentissage et de mémoire. Ce mécanisme semble dépendant du « brain-derived neurotrophic factor » (BDNF) (Parkhurst et al., 2013). Une autre fonction des microglies est de favoriser l'anastomose vasculaire en établissant des liens étroits avec des bourgeons endothéliaux et en intervenant dans la croissance des vaisseaux au niveau de la rétine (Fantin et al., 2010).

En plus de ces fonctions physiologiques essentielles au développement et au fonctionnement normal du SNC, les microglies sont capables de répondre aux attaques du SNC. Alors que le corps cellulaire des microglies est fixe en condition normale, leurs prolongements sont très motiles et sont en constant remodelage pour scanner l'environnement. Ainsi l'ensemble de l'espace extracellulaire est exploré en 2h. Lors d'une lésion, les microglies autour isolent la zone touchée en réorganisant leurs prolongements. Cette réponse est induite par la liaison d'ATP, d'ADP ou d'UTP aux récepteurs purinergiques des microglies (Davalos et al., 2005). Les microglies peuvent aussi s'activer dans certains contextes pathologiques (neurodégénérescence, infection, maladies métaboliques ou inflammatoires, tumeur etc.) suite à la fixation de facteurs endogènes ou exogènes. Il peut s'agir, par exemple, de composants viraux ou bactériens (« lipopolysaccharide » (LPS), CpG) reconnu par les « Toll like receptor » (TLR)), de protéines anormales (prion, β -amyloïde), de protéines du plasma (thrombine, albumine), de cytokines inflammatoires ou de médiateurs du complément. Elles prennent alors une forme amiboïde et elles vont recruter et activer des cellules immunitaires dans le parenchyme cérébral. Elles augmentent leur expression des molécules du CMH, de CD80 et CD86, leur capacité fonctionnelle (ex : phagocytose, sécrétion de cytokine), mitotique ainsi que la motilité de leur corps cellulaire (Ransohoff and Cardona, 2010; Ransohoff and Perry, 2009).

Les microglies peuvent à la fois sécréter des médiateurs neurotoxiques en réponse à une activation au LPS ou à l'interféron-gamma (IFN- γ) (protéase, cytokines pro-inflammatoires, O²⁻, glutamate) ou neuroprotective en réponse à l'exposition à l'IL-4 (« fibroblast growth factor beta » (FGF β), cytokine anti-inflammatoire, thrombospondine). Dans les maladies neurodégénératives, les microglies peuvent avoir un rôle protecteur en phagocytant les débris cellulaires et les protéines anormales ou neurotoxiques en libérant de façon excessive des cytokines (Salter and Stevens, 2017). Il a également été montré que les microglies induisent des dysfonctions dans le SNC des patients atteints de maladies neurodégénératives par un excès d'élagage synaptique. Ces dysfonctions microgliales sont liées à une augmentation de l'expression des protéines du complément (Hong et al., 2016; Lui et al., 2016; Vasek et al., 2016; Williams et al., 2016). De plus, les microglies activées peuvent aussi promouvoir un phénotype neurotoxique A1 délétaire des astrocytes observés dans les maladies neurodégénératives et notamment dans la SEP (Liddel et al., 2017). En outre, les microglies ne sont pas seulement des acteurs secondaires dans les atteintes du SNC. En effet, des études génétiques ont mis en évidence des variants, des sur-expressions ou des mutations de gènes microgliaux associés à une augmentation du risque de développer des maladies neurodégénératives (Colonna and Wang, 2016; Guerreiro et al., 2013; Zhang et al., 2013).

1.5 La barrière hémato-encéphalique

La BHE régule les échanges entre le sang et le parenchyme cérébral (Stork et al., 2008). Elle est composée de cellules endothéliales, de pieds astrocytaires, de deux lames basales, une astrocytaire et une endothéliale, de péricytes, et de neurites en contact avec les astrocytes. Les cellules microgliales peuvent aussi intégrer ce complexe neurovasculaire (Hawkins et al., 2006). Les péricytes enchâssés dans la lame basale sont importants pour le maintien de la barrière, la vasotonie et le contrôle de l'oxygénation (Winkler et al., 2011). Les jonctions étanches, présentes entre les cellules endothéliales cérébrales, forment un réseau complexe et empêchent les échanges passifs entre le sang et le parenchyme cérébral (Wolburg and Lippoldt, 2002). Les échanges se font grâce à l'expression polarisée de nombreux transporteurs actifs situés à la fois au niveau des membranes apicale et basale comme les « receptor-mediated transport » (RMT), les « active efflux transport » (AET) et les « carrier-mediated transport » (CMT). Les transporteurs permettent le passage de molécules nécessaires

au bon fonctionnement du parenchyme cérébral, mais ces derniers peuvent également refouler des molécules potentiellement toxiques. Ce sont les petites molécules hydrophobes qui passent le mieux la BHE, même si celle-ci est très perméable à certaines molécules hydrophiles comme le glucose et les acides aminés (Wong et al., 2013). Les protéines impliquées dans ces jonctions serrées sont entre autres les occludines, les claudines et les JAMs (Furuse et al., 1998; Furuse et al., 1993; Martin-Padura et al., 1998). La cohésion de la paroi se fait grâce aux jonctions adhérentes avec, par exemple, le complexe protéique cadhérine-caténine (Itoh et al., 1993). En condition physiologique, des cellules immunitaires peuvent entrer dans le SNC de façon transcellulaire ou paracellulaire grâce aux molécules d'adhésion, aux récepteurs de chimiokine et aux intégrines afin de faire de l'immuno-surveillance. Cette infiltration se fait en cinq étapes : capture/roulement, activation, adhésion, rampement, diapédèse. En condition pathologique, des bris dans la BHE et une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion peuvent conduire à une infiltration significative de leucocytes dans le SNC (Lecuyer et al., 2016).

1.6 Systèmes lymphatiques cérébraux

Le SNC a longtemps été décrit comme un organe immuno-privilegié en raison de la présence de la BHE et de l'absence de vaisseaux lymphatiques. Cependant cette affirmation est controversée ces dernières années par la preuve de l'existence d'une surveillance immunitaire et d'un réseau lymphatique dans le SNC (Engelhardt et al., 2016). En effet, des études ont permis de mettre en évidence un système appelé g-lymphatique ainsi que des vaisseaux lymphatiques au niveau des méninges (Iliff et al., 2012; Louveau et al., 2017; Louveau et al., 2015). En outre, une connexion entre ces deux structures a été démontrée (Aspelund et al., 2015).

Le système g-lymphatique est un système de drainage des fluides, des protéines solubles et des métabolites très important pour l'homéostasie du tissu et principalement actif pendant le sommeil. Il permet non seulement d'éliminer les déchets mais aussi de distribuer le glucose, les lipides, les acides aminés ou encore les neurotransmetteurs dans le SNC. On peut décrire le système g-lymphatique comme un flux polarisé convectif de liquide dans l'espace périveineux autour des veines larges profondes du parenchyme cérébral. Il est caractérisé par des échanges rapides entre le LCS et le liquide interstitiel qui est collecté puis drainé en dehors

du cerveau vers le système lymphatique cervical. Les canaux gliaux AQP4 ont un rôle important dans le transport convectif du fluide (Jessen et al., 2015).

Le second réseau lymphatique, au niveau des méninges est constitué de vaisseaux tapissant le sinus dural qui possèdent tous les marqueurs moléculaires des cellules endothéliales lymphatiques périphériques. Cette structure permet de transporter le liquide, les macromolécules et les cellules immunitaires provenant du LCS vers les ganglions lymphatiques cervicaux profonds. Ce réseau est important à la fois pour éliminer les macromolécules et pour la surveillance immunitaire du SNC (Louveau et al., 2015).

2.0 Le système immunitaire

Le système immunitaire (SI) est composé des systèmes immunitaires inné et adaptatif (Hoebe et al., 2004). Sa fonction est de lutter contre les infections et les cellules tumorales. Ce système complexe est doué de mémoire. Il est composé de multiples cellules présentes dans le sang, les organes lymphoïdes et les tissus qui migrent et coopèrent pour exercer leurs fonctions, ainsi que de facteurs solubles qui permettent la régulation des réponses, la coopération et la migration des cellules. Le SI inné est la première ligne de défense contre les pathogènes, il donne une réponse immédiate et stimule le système adaptatif qui produit une réponse plus tardive mais spécifique à l'antigène (Iwasaki and Medzhitov, 2015). Le SI inné inclut les monocytes, les macrophages, les cellules dendritiques (CD), les mastocytes, les cellules tueuses naturelles (NK), le complément et les granulocytes (basophile, éosinophile et neutrophile). Les lymphocytes T (LT) $\gamma\delta$ et les cellules T tueuses (NKT) partagent des propriétés des SI inné et adaptatif. Les cellules du SI adaptatif incluent les LT CD4 et CD8 ainsi que les lymphocytes B (LB) (Sharpe and Mount, 2015) (fig. 2).

Immunité innée (réponse rapide) Immunité adaptative (réponse lente)

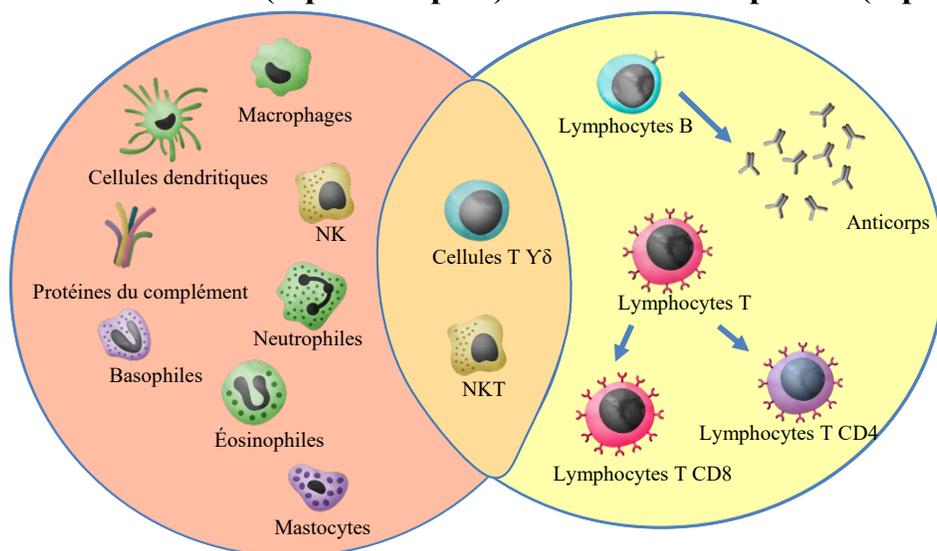


Figure 2 : Cellules du système immunitaire. Adapté de Dranoff G. 2004 Nature Reviews Cancer.

2.1 Le système immunitaire inné

Les cellules de l'immunité innée sont présentes dans les zones en contact avec l'extérieur (peau, muqueuses) ainsi que dans le sang et les ganglions. Des signaux de danger du non-soi autrement dit des microorganismes (bactéries, virus et parasites) ou du soi mais associés à des dommages cellulaires « damage associated molecular pattern » (DAMP) produits lors de stress ou de mort cellulaire (nécrose) peuvent activer le SI inné. Les agents infectieux contiennent des motifs appelés « pathogen associated molecular pattern » (PAMP) reconnus, tout comme les DAMPs, par les « pattern recognition receptors » (PRR) exprimés par de nombreux types cellulaires dont les cellules de l'immunité innée. Ces récepteurs incluent les TLRs, les C-type lectin receptors (CLRs), les NOD-like receptors (NLRs) et les RIG-I-like receptors (RLRs). L'activation de ces récepteurs par les différents signaux de danger déclenche une réaction inflammatoire avec une production de cytokines, de chimiokines et une extravasation des cellules immunitaires dans le site inflammatoire (Kumar et al., 2011). En outre, suite à une infection primaire, le SI inné est capable d'être entraîné et

d'augmenter ses fonctions effectrices afin de produire une protection plus efficace aux infections secondaires. Ceci est le résultat d'une reprogrammation épigénétique (Netea et al., 2016).

2.1.1 Les cellules présentatrices d'antigène

Les cellules présentatrices d'antigène (CPA) sont des cellules capables de capturer les antigènes, de les internaliser et les cliver pour les apprêter et les présenter sous forme de peptides par les molécules du CMH (Nakayama, 2014). Le CMH est l'ensemble des gènes codant pour les antigènes « Human leukocyte antigens » (HLA) chez l'humain dont la découverte a valu un prix Nobel de physiologie et de médecine à J. Dausset, G. Snell et B. Benacerraf en 1980. Il contient plus de 200 gènes placés sur le chromosome 6. Les molécules de classe I et II sont polymorphes, d'expression co-dominante et impliquées dans la présentation d'un peptide antigénique aux LT CD8 et CD4 respectivement. Les peptides se fixant aux CMH de classe I font entre 8 et 10 acides aminés alors que ceux se fixant au CMH de classe II font plus de 13 acides aminés (Neeffjes et al., 2011). Les molécules de la classe III sont des composants du complément et des molécules de l'inflammation (Milner and Campbell, 2001). Les molécules de classe I peuvent être présentes sur toutes les cellules nucléées de l'organisme alors que celles de classe II sont exprimées seulement sur les CPA.

Les interactions antigène-CMH sont caractérisées par leur faible affinité, leur faible constante de dissociation et le fait que seuls les peptides peuvent se lier (et non les protéines et antigènes lipidiques). Le CMH non lié à un peptide est instable (Lafuente and Reche, 2009). Les molécules de classe II sont classiquement chargées avec des peptides présents dans le compartiment vésiculaire, c'est la voie exogène de présentation antigénique (Watts, 2004). Les molécules de classe I sont chargées au niveau du réticulum endoplasmique (RE) avec des peptides formés dans le cytosol, c'est la voie endogène de présentation antigénique (Rock et al., 2004). Dans les CPA, on peut également retrouver une présentation d'antigène exogène sur les CMH de classe I, les peptides toujours chargés au niveau du RE peuvent venir de corps apoptotiques tumoraux ou de microbes opsonisés (Ackerman and Cresswell, 2004). L'opsonisation est le recouvrement d'une cellule cible pour favoriser sa phagocytose. Le complexe CMH-peptide est reconnu par le récepteur des LT (TCR) (Mempel et al., 2004). Les

CPA expriment également les molécules de co-stimulation CD80 et CD86 essentielles pour l'activation des LT en se liant au CD28 présent sur ces cellules (Brzostek et al., 2016).

Les monocytes une fois sortis de la circulation sanguine périphérique se différencient en CD ou en macrophages. Ces dernières, ainsi que les LB sont les CPA professionnelles (Mann and Li, 2014). Les signaux « danger » permettent la migration des CD vers les organes lymphoïdes secondaires où elles peuvent maturer et augmenter leur expression du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation (Guermonprez et al., 2002). Les niveaux d'expression du CMH et des molécules de co-stimulation par les macrophages augmentent suite à une exposition bactérienne ou à la présence de certaines cytokines (Mosser, 2003). Les LB peuvent internaliser spécifiquement les antigènes reconnus par leur récepteur de LB (BCR) avant de les dégrader et d'en présenter les peptides par les molécules du CMH. Ils peuvent également, comme les autres CPA, internaliser les antigènes par phagocytose ou pinocytose (Rodriguez-Pinto, 2005). Les LB expriment les molécules du CMH de façon constitutive, mais ils augmentent leur expression et celle des molécules de co-stimulation après activation (Batista and Harwood, 2009).

2.1.2 Les NK, NKT, LT $\gamma\delta$

Les cellules NK sont caractérisées par un large éventail de fonctions effectrices. Elles sont capables d'engendrer la mort de cellules cibles, principalement des cellules tumorales ou infectées mais aussi d'influencer les réponses immunitaires en régulant les réponses des LT CD4 ou des cellules dendritiques (Morandi et al., 2012; Moretta et al., 2003). Ces cellules contiennent des granules d'enzymes lytiques et peuvent lyser d'autres cellules via plusieurs mécanismes dont la cytotoxicité à médiation cellulaire dépendante des anticorps (ADCC). L'ADCC est importante pour la lutte contre le cancer. Elle consiste en la fixation par le récepteur Fc γ RIII de la partie constante (Fc) des immunoglobulines de type G (IgG) liées aux cellules cibles. Cette fixation permet l'activation des NK et la libération de la perforine et du granzyme afin de lyser la cellule cible.

Les cellules NK expriment des récepteurs inhibiteurs « killer-cell immunoglobulin-like receptors » (KIR) et activateurs « killer activating receptors » (KAR) et sont stimulées par l'IL-12 et IL-15. Les cellules normales non infectées expriment le CMH de classe I qui se fixe au KIR et inhibe le KAR, empêchant la lyse de la cellule cible. Toutefois, certains pathogènes

viraux (ex : adénovirus, virus herpès simplex, cytomégalovirus humain) peuvent inhiber l'expression du CMH de classe I afin d'éviter la reconnaissance par les LT CD8 (Fruh et al., 1997). Les cellules ainsi infectées et dépourvues de CMH peuvent conduire à l'activation des cellules NK via l'activation du KAR ; la cellule NK libère ainsi de la perforine et du granzyme permettant la lyse de la cellule n'exprimant pas le CMH.

Les LT $\gamma\delta$ sont principalement localisés dans les épithéliums, et reconnaissent les antigènes rencontrés dans les frontières épithéliales comme les phosphoantigènes des microbes ou des microbactéries. Ils présentent également des fonctions antivirales. Ils constituent entre 10 et 100% des cellules T présentes dans l'épithélium mais seulement de 1 à 5 % des cellules T présentes dans la circulation sanguine ou les organes lymphoïdes secondaires. Ils ont un rôle primordial dans l'homéostasie du tissu épithélial et dans la ré-épithélialisation suite à des dommages, entre autres, grâce à la sécrétion de facteurs de croissance. Ces cellules entretiennent ainsi les fonctions de barrière épithéliale. Elles procurent une réaction rapide et une protection vis à vis des pathogènes envahissants en sécrétant des peptides antimicrobiens, des médiateurs de l'inflammation et en permettant le recrutement de cellules effectrices. Les LT $\gamma\delta$ résident des épithéliums permettent également une tolérance microbiale de l'hôte, important par exemple au niveau de l'épithélium intestinal (Nielsen et al., 2017).

Les cellules NKT sont des cellules ayant des propriétés des cellules NK et des LT, elles reconnaissent uniquement les antigènes lipidiques présentés par le récepteur « class I MHC-like molecule » CD1d. On distingue deux populations de NKT, les NKT de type 1 ou invariants et les NKT de type 2 ou variants. Les NKT de type 1 possèdent une chaîne TCR- α invariante et un nombre limité de chaînes TCR- β non-invariantes. Les NKT de type 2 utilisent diverses chaînes TCR α et β . Les NKT de type 2 sont donc réactifs pour plusieurs auto-antigènes ou dérivés de microbes, ils sont plus abondants que les NKT de type 1. Les NKT de type 2 sont capable d'interagir avec d'autres cellules de l'organisme et de moduler leurs fonctions. Ainsi, ils peuvent induire l'activation et la différenciation des LB, inhiber les fonctions effectrices des LT, induire la tolérance des microglies et des CD. On observe également une régulation croisée des NKT de type 1 par les NKT de type 2 induisant l'anergie (Dhodapkar and Kumar, 2017). En outre, des études utilisant le modèle EAE, ont mis en

évidence un rôle préventif des NKT dans le développement de cette maladie (Jahng et al., 2004; Maricic et al., 2014).

2.2 Le système immunitaire adaptatif

C'est un système doté de mémoire, autrement dit la réponse immunitaire est plus rapide et intense lorsque le pathogène est rencontré pour la seconde fois. Les lymphocytes ont la possibilité de reconnaître un très grand nombre d'antigènes et de s'adapter à l'environnement grâce notamment à la très grande diversité du BCR ou du TCR d'expression clonale appelé répertoire. Chaque clone de lymphocyte est équipé d'un récepteur reconnaissant un certain nombre d'antigènes. A un instant donné, un individu possède plusieurs dizaines de millions de clones de lymphocytes de spécificités différentes dont une grande majorité est tolérante aux antigènes de soi. La diversité est dépendante de la génétique de chaque individu et se déroule dans les organes lymphoïdes primaires que sont le thymus et la moelle osseuse en deux phases (génération et sélection) (Cooper and Alder, 2006).

Le BCR est composé d'une chaîne légère et d'une chaîne lourde liées par des ponts disulfures ; le BCR est en fait une immunoglobuline ou un anticorps exprimé à la surface du LB. L'extrémité de chaque chaîne constitue une région hypervariable, respectivement VL pour la chaîne légère et VH pour la chaîne lourde. Chaque chaîne est constituée de régions constantes en plus de la région variable, une pour la chaîne légère CL et trois pour la chaîne lourde CH1, CH2 et CH3 (Treanor, 2012).

Le TCR est composé d'une chaîne α et une chaîne β , chacune composée d'une région constante C ($C\alpha$ ou $C\beta$ suivant la chaîne) et d'une région variable V à son extrémité ($V\alpha$ ou $V\beta$ suivant la chaîne). La région variable est responsable de la reconnaissance antigénique (Kuhns et al., 2006).

La génération de la diversité du BCR ou du TCR se fait par recombinaison somatique, autrement dit par rapprochement des régions V et C. La recombinaison permet le rapprochement des sous segments génétiques VI, J et Vh, D, J pour former respectivement les exons VL et VH pour le BCR ou $V\alpha$ et $V\beta$ pour le TCR. Il existe un grand nombre de sous segments génétiques, donc une possibilité de produire un grand nombre d'exons VH ou $V\beta$ et VL ou $V\alpha$ par recombinaison aléatoire (Hoehn et al., 2016; Laydon et al., 2015).

La sélection positive consiste en une absence de signal de mort entraînant la survie des lymphocytes qui reconnaissent les antigènes du soi avec une faible affinité. La sélection négative consiste en un mécanisme d'apoptose entraînant la mort des lymphocytes qui expriment un BCR ou un TCR ayant une forte affinité pour les antigènes du soi qui leur sont présentés durant leur maturation (Edry and Melamed, 2004; Starr et al., 2003).

2.2.1 Les lymphocytes T

Ce sont les cellules majeures de l'immunité adaptative. Elles ont un rôle dans le contrôle des infections, le rejet d'allogreffe, l'immunité anti-tumorale, l'hypersensibilité et la coopération avec les LB (von Andrian and Mackay, 2000). La maturation des LT a lieu dans le thymus (organe lymphoïde primaire-diversité).

A leur entrée dans le thymus les cellules sont au stade double négative et sont caractérisées par une absence d'expression de CD4, CD8, CD3 et TCR. Après l'étape de génération décrite précédemment, environ 60% d'entre elles deviendront des LT exprimant un TCR $\alpha\beta$ associé au CD3, et seront doubles positives CD4 et CD8. Entre les phases de sélections positive et négative décrites précédemment, les thymocytes au stade double positif deviendront pour la plupart simple positif CD4 ou CD8 (Takahama, 2006).

Les LT naïfs ainsi produits sont ensuite relâchés dans le sang et différenciés dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions) en LT CD4 dit « helper » (Th) ou auxiliaires effecteurs Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, en « T follicular helper » (Tfh), en LT « régulateurs » (LTreg) ou en LT cytotoxiques CD8. Une partie sera différenciée en LT effecteur et entrera dans les tissus exercer leur fonction de destruction des pathogènes, une autre en LT mémoire (Golubovskaya and Wu, 2016). Les LT naïfs se différencient dans la zone T des ganglions au contact des CD matures. Le premier signal induit par la liaison TCR/CMH-peptide entraîne une cascade de signalisation intracellulaire induisant un changement de fonction, d'expression de gènes, une différenciation et une activation cellulaire, mais n'est pas suffisant et doit être associé à un second signal pour que, la différenciation et la prolifération clonale des LT, soit complète. Le second signal correspond à l'interaction du CD28 avec le CD80 (B7-1) ou le CD86 (B7-2) et entraîne la production de l'IL2. Le CD28 est exprimé par les LT naïfs et activés (Corthay, 2006).

Les Th1 sont importantes pour l'immunité cellulaire et interviennent dans l'activation des macrophages, l'élimination des pathogènes intracellulaire et l'hypersensibilité retardée. Les Th2 sont importantes pour l'immunité humorale et interviennent dans la protection contre les microorganismes à habitat extracellulaire, la prolifération, l'activation et la différenciation des LB ainsi que l'hypersensibilité immédiate (allergie). Les Th17 interviennent dans l'inflammation tissulaire et les maladies auto-immunes. Elles ont un précurseur commun et la balance Th1/Th2/Th17 dépend de la nature des antigènes et des cytokines environnantes; l'IL-12 favorise la différenciation Th1, l'IL-4 la différenciation Th2, l'IL-6, l'IL-23 et le TGF- β la différenciation Th17. Tbet et Stat4 sont des facteurs de transcription importants pour la différenciation Th1, GATA3 et Stat6 pour la différenciation Th2, ROR γ T pour la différenciation Th17. Les Th1 produisent l'IFN γ , le TNF, l'IL-2 et le GM-CSF, alors que les Th2 produisent l'IL-4, l'IL-10, l'IL-13, l'IL-5 et l'IL-6. L'IL-4 et l'IFN γ induisent une régulation négative réciproque sur la balance Th1/Th2. Les Th17 produisent principalement les cytokines IL-17A, IL-17F, IL-21, IL-22 et le GM-CSF (Zhu et al., 2010).

Les fonctions des LT CD4 et CD8 effecteurs sont régulées négativement par les LTreg. Cette population de cellules est importante pour la tolérance périphérique et expriment le facteur de transcription FoxP3, la chaîne α du récepteur à l'IL2 CD25 ou encore des molécules d'inhibition comme le « cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4 » (CTLA-4). On peut noter que les protéines exprimées sur le LTreg sont communes aux LT activés, ceci suggère que l'activation des LTreg est nécessaire à l'induction des mécanismes suppresseurs des LT (Corthay, 2009).

Les LT CD8 sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires et d'induire l'apoptose des cellules cibles soit en expulsant les molécules cytotoxiques perforines et granzymes B soit via la voie Fas. La perforine s'insère dans la bicouche lipidique afin de permettre la pénétration dans la cellule du granzyme B. Le récepteur Fas contenant un domaine de mort FADD est exprimé sur les cellules cibles alors que le ligand FasL sur les LT CD8. Le granzyme B ou l'interaction Fas/FasL induisent l'activation en cascade de caspases conduisant à la mort de la cellule infectée (Wong and Pamer, 2003). Comme les LT CD4, les LT CD8 peuvent également être polarisés dépendamment de leur environnement en Tc1, Tc2, Tc17 et Tcreg. L'induction, les facteurs de transcription exprimés et les cytokines produites

sont similaires entre les Th1/Tc1, Th2/Tc2, Th17/Tc17 et Treg/Tcreg. Toutefois, moins d'études ont caractérisé en détails les facteurs contribuant à la polarisation des cellules T CD8 (Ley, 2014).

2.2.2 Les lymphocytes B

La maturation et la différenciation des LB se font en deux temps dans deux organes différents. La première phase de maturation décrite précédemment a lieu dans la moelle osseuse (organe lymphoïde primaire-diversité). La seconde phase d'activation et de différenciation se fait dans les organes lymphoïdes secondaires (rate, ganglions) et est dépendante de l'antigène et dans certains cas des LT CD4. Les LB activés se différencient en plasmocytes sécréteurs d'anticorps de même spécificité que leur BCR ou en LB mémoires. Les anticorps permettent une protection contre les pathogènes grâce à leurs régions variables par neutralisation des toxines bactériennes et des virus. Ils peuvent aussi grâce à leurs régions variables et constantes induire un lyse cellulaire de type ADCC, une activation du complément ou faire de l'opsonisation (LeBien and Tedder, 2008).

Les caractéristiques des réponses à anticorps sont leurs spécificités, le fait que les antigènes soient reconnus en absence de CMH et le grand nombre de clones permettant une large possibilité de reconnaissance antigénique, appelé « répertoire B ». Les antigènes peuvent être des protéines, des polysaccharides, des lipides couplés à des protéines et des acides nucléiques. Certains antigènes sont thymo-dépendants (protéines), c'est à dire qu'ils nécessitent l'intervention des LT CD4 pour induire l'activation et la différenciation des LB alors que d'autres sont thymo-indépendants (ex : polysaccharides, glycolipide) (McHeyzer-Williams and McHeyzer-Williams, 2005).

La réponse des LB aux antigènes T dépendants nécessite deux signaux. Le premier est la fixation de l'antigène au BCR entraînant l'augmentation de l'expression de la molécule de co-stimulation CD40 permettant aux LB de coopérer avec les LT CD4 activés qui expriment le CD40L. L'IL-1 sécrété par les CPA est importante pour cette activation des LB. Le deuxième est la formation du complexe CD40/CD40L permettant leur différenciation en plasmocytes et leur prolifération clonale. La coopération des LB et LT intervient dans la zone T des organes lymphoïdes secondaires. Suite à l'interaction, les LB et LT migrent et prolifèrent dans la pulpe rouge formant un follicule primaire puis progressivement un centre germinatif où se produit la

commutation isotypique, la maturation d'affinité des anticorps et la génération des LB mémoires (Parker, 1993). Les LTfh sont primordiaux pour les réponses T dépendantes des LB et représentent le type cellulaire clef pour la formation des centres germinatifs et pour la mise en place de la mémoire sérologique à long terme. La présentation antigénique par les CD permet l'augmentation de l'expression de CXCR5 et la perte d'expression de CCR7 sur les LTfh qui sont alors relocalisés de la zone T aux follicules. Ils se distinguent des autres LT CD4 par leur faible expression des facteurs de transcription (T-bet, GATA3, ROR γ T) et des cytokines (IFN γ , IL4, IL17) caractéristiques de ces cellules. Par contre ils expriment fortement CD40L et produisent l'IL21 important pour la différenciation des LB (Ma et al., 2012). Tous les isotypes sont générés à partir des LB à IgM. Lors de la commutation, les régions VH et VL sont conservées, seule la région constante CH est modifiée suite à l'épissage alternatif des gènes ; ainsi un clone de LB à IgM devient par exemple un clone de LB à IgG. Les cytokines orientent le profil isotypique des anticorps et donc le type d'immunité. Ainsi, par exemple l'IFN γ entraîne un profil IgG impliqué dans la phagocytose et l'activation du complément alors que l'IL-4 entraîne un profil IgE impliqué dans l'hypersensibilité immédiate et l'immunité contre les helminthes (Tangye et al., 2002).

La réponse aux antigènes T indépendants déclenche la production d'IgM. Les antigènes sont multivalents et forment un pontage BCR qui induit les deux signaux nécessaires à la prolifération et à la différenciation des LB. La réponse humorale primaire aux antigènes T indépendants est plus rapide mais de moins bonne qualité que celle aux antigènes T dépendants. En effet cette réponse n'induit pas ou peu de commutation isotypique, de maturation d'affinité et de mémoire (Defrance et al., 2011).

La réponse des LB est régulée par les liaisons d'immunoglobuline aux récepteurs Fc γ présents sur ces dernières, les récepteurs Fc γ RI, Fc γ RIIA et Fc γ RIII sont activateurs alors que le récepteur Fc γ RIIb est inhibiteur. L'opsonisation par le complément sensibilise également la réponse des LB (Hogarth and Pietersz, 2012; Morgan et al., 2005).

2.2.3 Mécanismes de tolérance et maladies auto-immunes

Grâce aux phases de sélection positive et négative expliquées préalablement, les lymphocytes sont majoritairement tolérants aux antigènes du soi à la sortie des organes lymphoïdes primaires, on parle de tolérance centrale. Les cellules épithéliales ainsi que le

cortex thymique sont requis pour la sélection positive des LT alors que ce sont les cellules épithéliales thymiques de la médulla (CETm) ainsi que les CD qui sont importants pour la sélection négative des LT (Gotter et al., 2004). Les CETm ont un rôle crucial et sont capables de présenter de multiples auto-antigènes tissus ou organes spécifiques aux LT, plus de 5000 ont été identifiés à ce jour. L'expression de ces gènes dit de promiscuité est régulée par la protéine « autoimmune regulator » (AIRE) (Kyewski and Derbinski, 2004). Cependant la tolérance centrale n'est pas complète, notamment car tous les auto-antigènes ne sont pas présents dans les organes lymphoïdes primaires.

Par conséquent, des mécanismes permettant la tolérance périphérique ont lieu dans les organes lymphoïdes secondaires ou les tissus périphériques. Suite à l'interaction avec l'auto-antigène, les lymphocytes peuvent être éliminés par apoptose (délétion), changer de phénotype ou encore devenir anergique (cellules non répondantes). Des CD tolérogènes ou les LTreg peuvent également bloquer l'activation des lymphocytes (Meffre and Wardemann, 2008; Xing and Hogquist, 2012). À la fois les voies apoptotiques Fas et Bim interviennent dans l'élimination des LT auto-réactifs (Bouillet et al., 2002; Cohen and Eisenberg, 1991). Une cellule T devient anergique lorsqu'elle est activée en absence de second signal (ex : co-stimulation CD28) ou en présence d'un second signal négatif. Les principales voies inhibitrices sont « programmed death 1 » (PD1) / PDL1 et PDL2 qui permet le recrutement de phosphatase et CD152 / CD80 et CD86 qui empêche la progression du cycle cellulaire (Chambers and Allison, 1999; Keir et al., 2008). PD1 peut également médier la conversion des LT naïfs en LTreg (Fife and Pauken, 2011). Ces dernières peuvent agir par contact direct récepteur-ligand mais aussi exercer leur activité suppressive en libérant des cytokines anti-inflammatoires ou en induisant un environnement hypoxique favorable à l'anergie via l'expression à leur surface de CD73 et CD39 (Chappert and Schwartz, 2010; Roncarolo et al., 2001; Sitkovsky, 2009). Les LT CD4 jouent un rôle important dans l'élimination des LB auto-réactifs périphériques grâce au CMH de classe 2 et aux interactions CD40/CD40L et Fas/FasL (Rathmell et al., 1995). Les CD tolérogènes sont des cellules qui échouent à délivrer un signal de co-stimulation adéquat lors de la présentation antigénique (Gallucci et al., 1999). Elles sont générées par maturation incomplète et maintenues notamment par les cytokines anti-inflammatoires IL-10 et TFG- β (Morelli and Thomson, 2007). En condition physiologique il reste tout de même des lymphocytes auto-réactifs, malgré cela, la tolérance est maintenue et

les auto-antigènes sont ignorés. Ceci peut par exemple être expliqué par le fait que le niveau d'antigène soit inférieur au seuil requis pour induire l'activation ou la délétion des cellules (Ferber et al., 1994).

Les maladies auto-immunes sont caractérisées par une rupture de la tolérance entraînant une attaque des cellules ou molécules du soi. Autrement dit, il y a un déficit de contrôle ou d'élimination des lymphocytes auto-réactifs. On observe alors un déséquilibre entre les réponses immunitaires régulatrices et effectrices (Rosenblum et al., 2015). Généralement, des facteurs à la fois environnementaux et génétiques sont à l'origine du développement de ces maladies. Cependant, il existe des maladies auto-immunes purement génétiques. Par exemple, le « syndrome d'immunodérégulation, polyendocrinopathie, entéropathie auto-immune lié au chromosome X » (IPEX) est causé par une mutation de *Foxp3* qui diminue les fonctions suppressives des *LTreg* et impacte les tolérances centrale et périphérique (Chatila et al., 2000). Les mutations dans les gènes codant pour le CMH sont souvent associées à une prédisposition des individus pour le développement de maladies auto-immunes mais ne sont pas suffisantes et doivent être associées à des stimuli environnementaux. On peut par exemple citer les traumatismes qui peuvent rendre accessible les auto-antigènes séquestrés ou les infections (Marrack et al., 2001). En cas d'infection, l'inflammation induite peut non seulement favoriser l'accessibilité aux auto-antigènes mais aussi sur-activer les CPA et promouvoir leur capacité à présenter des peptides du soi (Vella et al., 1997). L'inflammation peut aussi induire l'expression de CMH de classe 2 et de protéine de co-stimulation par les cellules endothéliales et épithéliales et ainsi augmenter l'exposition des LT aux protéines présentes dans ces cellules (Romagnani, 2006). D'autres processus pouvant être à l'origine du développement de maladies auto-immunes sont le mimétisme moléculaire et l'essaimage antigénique. Il y a mimétisme moléculaire lorsqu'un LT auto-réactif est activé du fait qu'il reconnaît un peptide microbien relativement similaire. L'essaimage antigénique est l'activation de nouveaux LT auto-réactifs lors d'infection chronique ou aiguë par diversification des épitopes ciblés (Cusick et al., 2012; Tuohy and Kinkel, 2000). En outre, ces deux mécanismes ne sont pas spécifiques à l'auto-immunité (Terada and Liu, 2014; Vanderlugt and Miller, 2002).

Les Th1, généralement associés aux LT CD8, sont impliqués dans le développement de maladies auto-immunes organe-spécifiques telles que le diabète de type 1 ou la SEP (Liblau et al., 1995; Romagnani, 1997; Tato and O'Shea, 2006). Les Th1 constituent un sous type pathologique alors que les Th2 exercent un effet inhibiteur (Nicholson and Kuchroo, 1996). Par contre, bloquer la signalisation IFN- γ ou agir sur les gènes intervenant dans la différenciation et la stabilisation des Th1 ne protège pas contre le développement de maladie auto-immune suggérant l'intervention d'autres cellules effectrices (Ferber et al., 1996; Gran et al., 2002; Matthys et al., 1998). Des études ont ainsi démontré l'implication des Th17, ces cellules seraient même plus efficaces que les Th1 à induire les maladies auto-immunes (Langrish et al., 2005). De plus, les Th1 pourrait être plus facilement contrôlés par les LT reg que les Th17 (Korn et al., 2007). On observe une dichotomie entre la génération des Th17 qui peuvent induire l'auto-immunité et les Treg qui au contraire peuvent inhiber l'auto-immunité. En effet alors que le TGF- β intervient dans la différenciation de ces 2 types cellulaires l'IL6 induit les Th17 mais inhibe le développement des LTreg (Bettelli et al., 2006). Il existe également des cellules dans un état transitionnel capables de sécréter à la fois de l'IL17 et de l'IFN- γ et qui pourraient se différencier en Th1, Th17 ou LTreg suivant les phases de la maladie (Deshpande et al., 2007). Une hypothèse concernant la pathogénèse de maladie auto-immune organe spécifique est que les Th17 sont les premières cellules effectrices à infiltrer l'organe cible. Leur sécrétion de cytokines pro-inflammatoires permettrait l'induction de chémokines impliquées dans le recrutement des Th1. Ensuite d'autres cellules immunitaires pourraient intervenir et infiltrer le tissu cible. En outre, le fort taux de cytokines pro-inflammatoires tel que l'IL6 empêcherait les LTreg accumulés dans le tissu de réguler les cellules effectrices et de prévenir les dommages tissulaires (Dardalhon et al., 2008).

3.0 La famille NKG2

« Natural killer group 2 » (NKG2) est une famille de récepteurs activateurs ou inhibiteurs exprimés sur les NK et certains sous types de cellules T (Borrego et al., 2006). Le NKG2A et le NKG2C forment un hétérodimère avec la molécule CD94 et reconnaissent le ligand HLA-E chez l'humain et Qa-1 chez la souris (Vance et al., 1999; Vance et al., 1998;

Wada et al., 2004). Le NKG2A contient un motif « immunoreceptor tyrosine-based inhibition motif » (ITIM) au niveau de sa queue cytoplasmique et est donc associé à une voie de signalisation inhibitrice (Borrego et al., 2005). Le NKG2C ne contient pas d'ITIM et transmet des signaux activateurs via la molécule adaptatrice DAP12 (Wei et al., 2014). Quelques publications ont rapporté l'expression des molécules NKG2B, NKG2E, NKG2F et NKG2H sur certaines populations cellulaires mais les fonctions de ces autres protéines de la famille NKG2 sont peu connues (Bellon et al., 1999; Huang et al., 2010; Lieto et al., 2006; Orbelyan et al., 2014; Sullivan et al., 2007). Toutefois, le NKG2D est différent des autres membres de la famille de par sa composition et ses ligands, il ne partage qu'environ 20% de sa séquence protéique avec les autres membres de la famille (Gunturi et al., 2004).

3.1 Le récepteur NKG2D

NKG2D est exprimé sous forme d'homodimère lié par un pont disulfure et présent sur toutes les NK, la majorité des NKT, une sous population de CD4 et de $T\gamma\delta$, tous les LT CD8 chez l'humain mais seulement les LT CD8 activés chez la souris. Certains macrophages peuvent également exprimer le NKG2D chez la souris (Lanier, 2015). Le NKG2D est une glycoprotéine membranaire de type II avec un domaine extracellulaire de type lectine C (Houchins et al., 1991). Il est codé par le gène *killer cell lectin-like receptor subfamily K, member 1 (KLRK1)* présent sur le chromosome 12 (12p13.2) chez l'humain et 6 (6F3) chez la souris (Glienke et al., 1998; Ho et al., 1998). On retrouve 70% d'homologie de séquence entre humains et souris.

NKG2D est associé à une molécule adaptatrice DAP10 chez l'humain et deux molécules adaptatrices DAP10 ou DAP12 chez la souris par leur domaine transmembranaire respectif (Gilfillan et al., 2002; Wu et al., 1999). Chez la souris, on observe un épissage alternatif de NKG2D résultant d'une forme courte NKG2D-S capable de lier DAP10 ou DAP12, présente sur les NK activés et une forme longue NKG2D-L capable seulement de lier DAP10, présente sur les NK activés ou au repos et les LT CD8 activés (Diefenbach et al., 2002; Lanier, 2015). Chaque sous unité du récepteur est liée à un homodimère DAP10 ou DAP12, formant un complexe hexamérique (Garrity et al., 2005) (fig. 3). Certains individus expriment une forme tronquée de NKG2D (NKG2DT) où il manque le domaine extracellulaire, par contre le domaine intracellulaire est complet, entraînant une compétition

entre NKG2D et NKG2DT pour DAP10 et résultant d'une diminution de récepteur fonctionnel exprimé à la surface des cellules. Le NKG2DT est dégradé dans le cytoplasme (Karimi et al., 2014). La concentration intracellulaire de magnésium est critique pour l'assemblage du complexe NKG2D-DAP10 (Chaigne-Delalande et al., 2013). Les voies de signalisation induites dépendent des protéines adaptatrices DAP10 et DAP12 (fig.3). DAP10 possède un motif YINM, similaire au CD28, permettant le recrutement de la sous unité p85 de PI3 kinase et du complexe Grb2-Vav1. Ceci va entraîner la phosphorylation des protéines « extracellular signal-regulated kinase » (ERK) et ERK « activator kinase » (MEK) ainsi qu'une augmentation du taux de calcium intracellulaire. Ce signal de transduction est à l'origine d'une réponse cellulaire cytotoxique avec la dégranulation de protéines lytiques. PI3 kinase va également pouvoir phosphoryler Akt et activer les voies de survie et de prolifération cellulaire (Upshaw et al., 2006). DAP12 possède un motif ITAM similaire au TCR, BCR et FcR qui recrute les protéines kinases Syk et Zap70 induisant la phosphorylation de la « phospholipase C gamma » (PLC γ) et l'activation de PI3 kinase. Ainsi, cette voie de signalisation va mener à une production de cytokines pro-inflammatoires tel que l'IFN γ (Lanier et al., 1998). Pour résumer, NKG2D est impliqué dans l'induction des fonctions effectrices de cellules immunitaires comme les cellules NK et les LT CD8 qui sont 2 types cellulaires essentiels pour la prévention des cancers ou la lutte contre les virus. La bonne régulation des interactions NKG2D-NKG2DL est importante pour contrôler les cellules anormales mais aussi pour préserver les cellules saines.

Cellules NK au repos et LT CD8 activés

Cellules NK activées

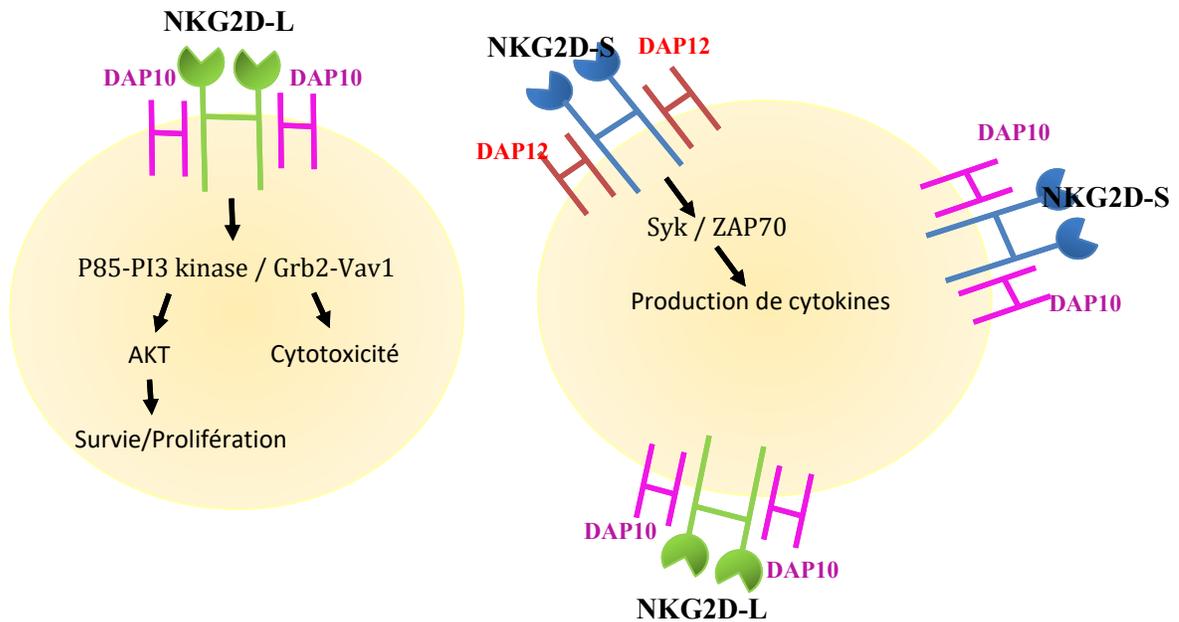


Figure 3 : Le récepteur NKG2D chez la souris. Adapté de Lewis L. Lanier. 2015
Cancer Immunology research.

L'expression du NKG2D et du DAP10 est régulée par les cytokines à la fois aux niveaux transcriptionnel et post-transcriptionnel. Ainsi, l'IL-2, l'IL-7 et l'IL-15 augmentent l'expression de NKG2D alors que le TGF- β et l'IL-21 diminuent l'expression de NKG2D à la fois sur les NK et les LT CD8 (Burgess et al., 2006; Crane et al., 2010; Hu et al., 2014; Maasho et al., 2005; Muntasell et al., 2010; Park et al., 2011; Roberts et al., 2001; Zhang et al., 2008).

Bien que le NKG2D soit constitutivement exprimé sur les NK et LT CD8 humains au repos, la signalisation via ce récepteur n'est pas suffisante pour induire la production de cytokines ou les réponses cytotoxiques. Il faut l'engagement du NKG2D et d'une autre molécule co-stimulatrice (CD335 ou CD244) pour induire des activités cytotoxiques par les NK au repos. Cependant, si les NK sont activées, par exemple par l'IL-2 ou l'IL-15, alors

l'interaction du NKG2D avec un de ses ligands (NKG2DL) suffit à initier la dégranulation et la production de cytokines (Bryceson et al., 2006; Ehrlich et al., 2005). En ce qui concerne les LT CD8 humains, l'interaction NKG2D-NKG2DL associée à l'activation du TCR permet d'augmenter l'activation des cellules déjà activées préalablement mais n'a pas d'effet sur les LT CD8 naïfs (Verneris et al., 2004). Dans un contexte pathologique, l'activation via le NKG2D peut toutefois être suffisante pour déclencher des réponses cytotoxiques. En effet, les LT CD8 intestinaux issus de patients ayant la maladie cœliaque peuvent présenter des réponses cytotoxiques *in vitro* suite à la stimulation du NKG2D sans co-stimulation du TCR, probablement grâce à l'exposition excessive à l'IL-15 reçue dans le tissu inflammé (Meresse et al., 2004).

Chez les souris, contrairement aux humains, les NK au repos peuvent directement entraîner leurs réponses effectrices suite à la liaison entre le NKG2D et un de ses NKG2DL (Jamieson et al., 2002). Cette différence peut venir de la molécule adaptatrice DAP12 présente uniquement chez les souris. Sur les LT CD8 activés, la co-stimulation via NKG2D augmente les fonctions cytotoxiques de ces cellules de manière similaire à la co-stimulation via CD28 (Markiewicz et al., 2005).

Chez l'humain, la séquence codante du NKG2D ne présente que deux polymorphismes dont l'un entraîne un changement d'un acide aminé (Thr72Ala) au niveau du domaine transmembranaire de la protéine. Celui-ci est associé à un risque accru de développer le cancer du col de l'utérus ou le lupus érythémateux disséminé (Piotrowski et al., 2012; Roszak et al., 2012). Par contre on observe d'autres polymorphismes non codant, notamment dans la région 3'UTR, associés à des NK plus ou moins cytotoxiques et à une modulation du risque de cancer. En effet, les cellules NK possédant l'haplotype HNK de NKG2D ont une plus grande activité que celles possédant l'haplotype LNK et sont associées à une diminution du risque de cancer. Lors de la transplantation de moelle osseuse, pour une même population de patients, ceux recevant des cellules souches venant de donneurs possédant l'haplotype HNK présentent de meilleurs résultats cliniques (Espinoza et al., 2009; Hayashi et al., 2006). Chez les souris, le nombre de polymorphismes est également limité.

L'interaction de NKG2D avec ses NKG2DL est impliquée à la fois dans la surveillance d'infection virale et la prévention des cancers. En outre le NKG2D étant constitutivement exprimé sur les NK et une partie des LT, l'étendue de ses fonctions et la régulation des réponses dépend beaucoup de la biologie de ces ligands (Carapito and Bahram, 2015).

3.2 Les ligands de NKG2D

Chez l'humain, deux familles de NKG2DL ont été décrites, les « non conventional MHC class I chain-related » (MICs) et les « UL16-binding protein » (ULBPs) aussi appelées « retinoic acid early transcripts 1 » (RAET1).

La famille MIC est composée de deux ligands MICA et MICB, dont les gènes sont localisés avec ceux codant pour le CMH dans le chromosome 6 (6p21.3) (Bahram et al., 1996a; Bahram et al., 1996b). Les MIC ont un polymorphisme élevé, on retrouve 79 séquences protéiques différentes pour MICA et 26 pour MICB (<https://www.ebi.ac.uk/ipd/imgt/hla/stats.html>). Pour certaines séquences, le domaine de liaison à NKG2D ne se trouve pas à la même position dans la protéine suggérant des fonctions différentes ou du moins des mécanismes de reconnaissances différents de ces ligands (Stephens, 2001). De plus, plusieurs polymorphismes ont un impact important sur la structure ou la stabilité de la protéine (Li et al., 2000). En outre, on remarque des surreprésentations de certains allèles dans certaines régions du globe, suggérant une sélection des variants protéiques encouragée par l'environnement microbien local (Gonzalez et al., 2006). La famille de ligand MIC est absente chez les souris (Kondo et al., 2010).

La famille des ULBPs humains comprend 6 membres, les ligands : ULBP1 (RAET1I), ULBP2 (RAET1H), ULBP3 (RAET1N), ULBP4 (RAET1E), ULBP5 (RAET1G) et ULBP6 (RAET1L). Les gènes codant pour ces protéines sont également localisés sur le chromosome 6 mais sur le bras opposé à celui où sont situés les gènes CMH (entre 6q24.2 et 6q25.3) (Radosavljevic et al., 2002). Cette famille présente beaucoup moins de polymorphisme que la famille MIC ; toutefois, on observe une claire variation des allèles prévalant entre les différentes populations répondant probablement à une sélection influencée par l'environnement géographique (Antoun et al., 2010; Romphruk et al., 2009).

Chez les souris, on observe 3 familles de NKG2DL : « retinoic acid early 1 » (RAE-1), « histocompatibility 60 » (H60) et « murine UL-16-binding protein-like transcript 1 »

(MULT1). Les C57BL/6J expriment RAE-1 δ , RAE-1 ϵ , H60b, H60c et MULT1. D'autres souches de souris expriment également les RAE-1 α , RAE-1 β , RAE-1 γ et H60a. Les cinq gènes RAE-1 ont une séquence à plus de 85% identiques. Les gènes codant pour ces protéines sont localisés sur le chromosome 10 (entre 10A1 et 10A3) (Arapovic et al., 2009; Diefenbach et al., 2003; Lodoen et al., 2003; Samarakoon et al., 2009; Takada et al., 2008).

Les MICs, les ULBP 4 et 5 ainsi que le MULT1, les H60a et H60b sont des protéines transmembranaires avec une queue cytoplasmique alors que les ULBP 1, 2, 3 et 6 ainsi que les RAE-1 et H60c possèdent un ancrage glycosylphosphatidylinositol (GPI). Les ULBP2 et ULBP5 peuvent être exprimés sous les deux formes : transmembranaires et avec une ancre GPI. Les MICs possèdent trois domaines α extracellulaires, alors que les autres NKG2DL n'en possèdent que deux (Lanier, 2015) (fig. 4). L'existence d'une queue cytoplasmique suggère une potentielle signalisation en aval des ligands. Cependant il n'existe pas de littérature allant dans ce sens. L'affinité des NKG2DL pour NKG2D varie suivant les ligands mais aussi suivant les allèles. Certains ligands ont seulement 25% d'homologie de séquence. Chez les souris, le ligand avec la plus grande affinité pour son récepteur est le MULT1 ($K_d=0,006\mu\text{M}$), puis les RAE-1 (K_d entre $0,02\mu\text{M}$ et $0,726\mu\text{M}$) et les H60 (K_d entre $0,026\mu\text{M}$ et $8,7\mu\text{M}$) (Fig. 5). Chez l'humain, seules les affinités pour les MICs et l'ULBP1 sont connues et se situent entre $K_d=0,8\mu\text{M}$ (MICB) et $K_d=1,1\mu\text{M}$ (ULBP1) (Carayannopoulos et al., 2002a; Carayannopoulos et al., 2002b; O'Callaghan et al., 2001; Takada et al., 2008). Ces affinités sont en moyenne 10 fois plus grandes que celles de beaucoup d'interactions ligands-récepteurs associées aux cellules immunitaires. Par exemple, l'affinité de la liaison CMH de classe I avec le CD8 est entre $K_d=10\mu\text{M}$ et $K_d=200\mu\text{M}$ et celui de la liaison CMH de classe II avec le CD4 entre $K_d=150\mu\text{M}$ et $K_d=200\mu\text{M}$ (Stone et al., 2009).

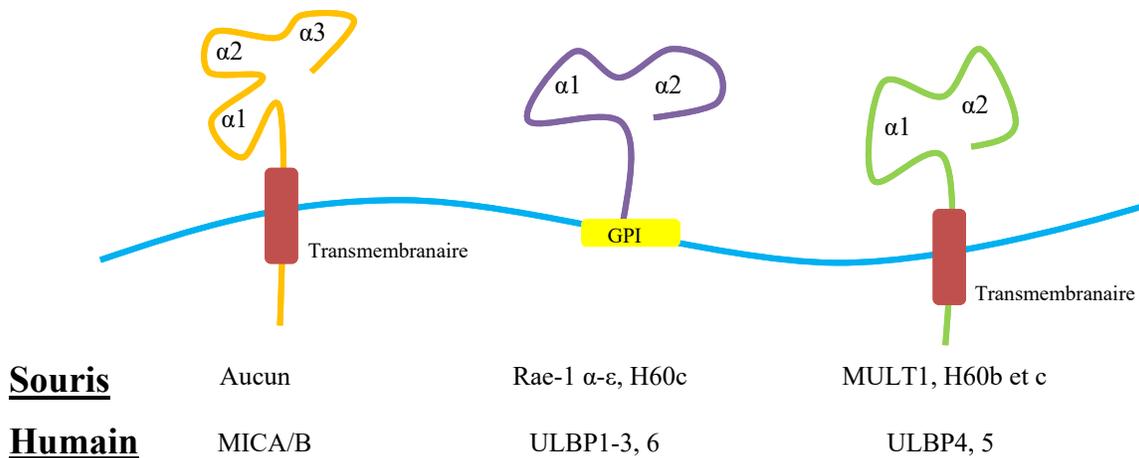


Figure 4 : Les ligands de NKG2D. Adapté de Molfetta et al. 2016 Trends in immunology

L'expression des NKG2DL est non-déetectable ou très faible en condition physiologique normale mais elle est induite suite à un stress cellulaire causé par exemple par une infection, l'inflammation ou une transformation maligne mais aussi lors de l'expression des protéines de choc thermique, de stress oxydatif ou de radiations ionisantes (Gasser et al., 2005; Groh et al., 1996; Lodoen and Lanier, 2006; Venkataraman et al., 2007; Yamamoto et al., 2001).

Les dommages à l'ADN constituent la voie de signalisation centrale pour réguler l'expression des ligands de NKG2D, elle fait intervenir p53 qui augmente fortement l'expression des ULBP1 et ULBP2 (Gasser et al., 2005; Textor et al., 2011). Certains facteurs de transcription (HSF1, E2F, NFκB, Sp, AP-1 et AP-2), les miARN, l'activation des TLRs, l'induction de la PI3K, la tumorigénèse ou encore les IFN de type I ou II participent à la régulation de l'expression des ligands de NKG2D (Hamerman et al., 2004; Jinushi et al., 2003; Jung et al., 2012; Lin et al., 2012; Raullet et al., 2013; Routes et al., 2005; Stern-Ginossar et al., 2008; Tokuyama et al., 2011; Venkataraman et al., 2007).

Chaque NKG2DL a un patron d'expression spécifique en fonction des cellules tumorales reflétant possiblement des fonctions variables des différents ligands. Par exemple, les MICs sont plus fréquents sur les tumeurs épithéliales alors que les ULBPs sont plus fréquents chez les patients avec une leucémie lymphoïde. Les ligands MICA et ULBPs sont co-exprimés sur les lignées cellulaires de carcinome ou de cancer du poumon alors que MICA

est plus exprimé que les ULBPs sur les lignées cellulaires de mélanomes (Bauer et al., 1999; He et al., 2013; Pende et al., 2002; Salih et al., 2003). L'expression des RAE-1 et des H60 est augmentée sur les lignées cellulaires murines cancéreuses hématopoïétiques, de la peau, des reins et des poumons (Girardi et al., 2001; Smyth et al., 2004). Les NKG2DL sont aussi induits dans les cellules infectées avec des bactéries intracellulaires ou des virus. Ainsi, le MICA est détecté à la surface des lignées cellulaires infectées par *Escherichia coli* ou le *Mycobacterium tuberculosis*, alors que le MICB est exprimé sur les macrophages humains infectés par le virus influenza. Des NKG2DL sont aussi induits sur des cellules dendritiques en réponse aux pathogènes microbiens (Das et al., 2001; Siren et al., 2004; Tieng et al., 2002). Des études ont aussi mis en évidence que les greffons rejetés, à la fois chez les souris et l'humain présentent une augmentation de l'expression des NKG2DL (Kim et al., 2007; Suarez-Alvarez et al., 2007).

La régulation de l'expression des ligands peut se faire au niveau protéique, des transcrits ou des gènes (Raulet et al., 2013). Le MULT1 peut être régulé au niveau des protéines. Il peut être réprimé par la fixation des « transmembrane E3 ubiquitin ligase MARCH4/9 », peut aussi être clivé et libéré sous forme soluble par les métalloprotéinases de la matrice (MMP) ou encore ubiquitinilé et dégradé dans des lysosomes. De plus les niveaux d'ARNm codant pour le MULT1 semblent aussi régulés en réponse aux dommages à l'ADN même si le mécanisme de stabilisation des transcrits n'a été spécifiquement montré que pour RAE-1. L'expression de RAE-1 peut également être régulée au niveau des gènes grâce, par exemple, à la famille de facteurs de transcription E2F ou les protéines activatrices du complexe de transcription AP-1 et AP-2 (Deng et al., 2015; Jung et al., 2012; Nausch et al., 2006; Nice et al., 2009; Nice et al., 2010; Raulet et al., 2013). Les ligands humains de la famille MIC ou ULBP peuvent tous être régulés à la fois au niveau, des protéines par clivage par les MMP, des transcrits par blocage de la dégradation des ARNm et des gènes par des facteurs de transcription (E2F, p53, NF-kB, famille Sp ou AP-1 et AP-2) ou la voie de choc thermique (Li et al., 2011; Lin et al., 2012; Liu et al., 2010a; Lopez-Soto et al., 2006; Nachmani et al., 2009; Salih et al., 2002; Venkataraman et al., 2007).

Bien que les NKG2DL soient principalement exprimés en condition pathologique certaines cellules expriment les NKG2DL en conditions physiologiques normales. Par exemple, les transcrits de RAE-1 β et γ chez la souris sont exprimés dans le cerveau au stade

embryonnaire suggérant un rôle pour ces ligands lors du développement (Nomura et al., 1996). En outre ce rôle doit rester limité puisque les souris déficientes pour les RAE-1 sont viables (Deng et al., 2015). Un autre exemple est l'expression des ligands humains et souris à la surface des cellules de la moelle osseuse comme les cellules stromales et les cellules progénitrices myéloïdes (Ogasawara et al., 2004; Poggi et al., 2005). En outre, le niveau d'expression de ces ligands reste faible en conditions physiologiques normales et pourrait être insuffisante pour induire l'activation des cellules immunitaires exprimant le NKG2D.

Par conséquent, le rôle de ces ligands est d'alerter le SI de la présence de cellules anormales et d'induire une réponse cytotoxique et cytokinique via la signalisation NKG2D, notamment par les LT CD8 et les NK (fig. 5).

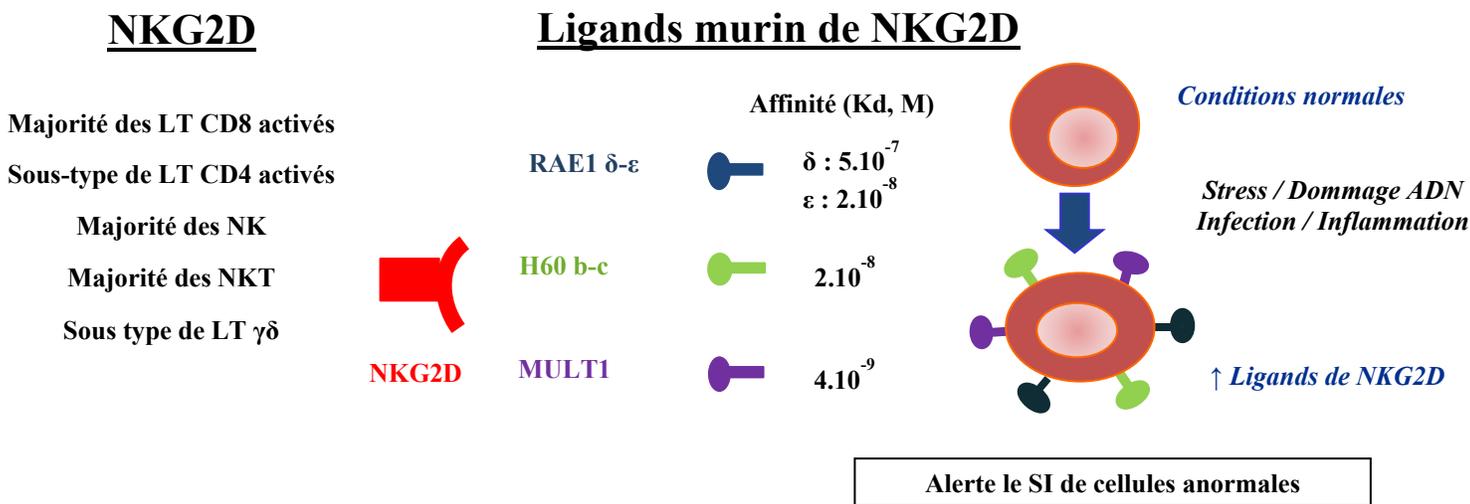


Figure 5 : NKG2D et ses ligands

3.4 Dérégulation de la voie NKG2D-NKG2DL

L'interaction NKG2D-NKG2DL est une voie activatrice des cellules immunitaires importante pour la prévention de pathologies infectieuses et tumorales. Par contre, une dérégulation de cette voie de signalisation via le NKG2D peut avoir des conséquences délétères (Mistry and O'Callaghan, 2007). En effet, comme décrit dans le paragraphe 3.3.1 ci-

dessous, une absence d'expression suffisante des NKG2DL est liée à la propagation d'infection ou de métastases. Au contraire, une expression aberrante des NKG2DL et donc une sur-activation des cellules immunitaires via le NKG2D, peut induire ou exacerber le développement de maladies auto-immunes ou inflammatoires tels que l'arthrite rhumatoïde, la maladie cœliaque, la maladie de Crohn, le diabète de type I ou la sclérose en plaques (SEP). Les données pour ces maladies seront détaillées ci-dessous dans le paragraphe 3.3.2.

3.3.1 Virus et cancer

Les souris déficientes pour le NKG2D sont plus sujettes au développement de cancer par rapport aux souris sauvages prouvant l'importance de l'interaction NKG2D avec ses ligands dans la prévention du cancer (Guerra et al., 2008). En effet, malgré le fait que ces souris présentent des cellules NK avec un développement et des fonctions non altérées, l'absence de NKG2D induit un déficit de surveillance tumorale conduisant à une plus haute incidence ou une accélération de la progression des cellules malignes. Les virus ou les cellules tumorales ont développé des mécanismes permettant d'échapper aux signalisations dépendantes du NKG2D. Ceci met en évidence l'importance de cette voie de signalisation pour lutter contre la progression de ces pathologies. Les virus peuvent être impliqués dans la production de molécules d'évasion capables de bloquer la traduction des NKG2DL, de se lier aux ligands et de les séquestrer dans le réticulum endoplasmique (RE) ou le Golgi, d'empêcher leur interaction avec le NKG2D ou encore de promouvoir leur dégradation par le lysosome (Ashiru et al., 2009; Fielding et al., 2014; Matusali et al., 2013; Stern-Ginossar et al., 2007). Une molécule d'évasion donnée ne peut pas interagir avec tous les NKG2DL d'où l'intérêt d'avoir une multitude de ligands permettant de déjouer ces mécanismes d'échappement. De même, ces molécules ne sont pas capables de lier tous les polymorphes d'un ligand.

Un autre mécanisme d'évasion est la perte de l'expression des NKG2DL fonctionnels à la surface cellulaire associée à une augmentation du taux de ligands solubles. Les ligands peuvent devenir solubles par clivage au niveau de la membrane plasmique par les protéases ou les phosphodiesterases, par un épissage alternatif ou par leur sécrétion dans des exosomes (Cao et al., 2007; Chitadze et al., 2013; Sun et al., 2011). Cependant le clivage enzymatique

semble être la voie principale à l'origine des ligands solubles. Des différences ont été observées dans la possibilité de cliver ou non les différents ligands et les polymorphes de NKG2D et donc de maintenir l'alerte ou non donnée au SI, prouvant là encore l'avantage pour la défense contre les pathologies d'avoir de multiples NKG2DL. La répression de la transcription et la surexpression de microARN suppresseur entraînant la baisse d'expression des NKG2DL sont aussi des mécanismes d'évasion (Heinemann et al., 2012; Kato et al., 2007). Par exemple, divers microARN produits par les cellules tumorales ou les herpesvirus comme le « Epstein-Barr virus » sont capables de se fixer à la région 3'UTR des MIC et d'atténuer l'expression des NKG2DL (Nachmani et al., 2009).

Une corrélation est établie entre le niveau de NKG2DL soluble dans le sérum des patients atteints de cancer et la progression de leur maladie. Plus le niveau de ligands solubles est élevé plus le pronostic est mauvais. En effet, les cellules tumorales n'exprimant pas ou moins les NKG2DL échappent à la réponse effectrice cytotoxique enclenchée par les cellules immunitaires exprimant le NKG2D. Ces dernières sont, de plus, désensibilisées par la fixation des NKG2DL solubles à leur surface (Paschen et al., 2009; Rebmann et al., 2007; Tamaki et al., 2010). Par contre, à l'opposé des autres ligands, le MULT1 soluble augmente les capacités effectrices des NK et potentialise l'élimination des cellules cancéreuses. En effet, les NK sont désensibilisées par les NKG2DL exprimés par les cellules non tumorales associées à ces dernières et l'interruption de cette interaction par le MULT1 soluble prévient la désensibilisation (Deng et al., 2015).

3.3.2 Maladies auto-immunes et inflammatoires

Plusieurs études suggèrent l'implication du NKG2D et ses ligands dans les maladies inflammatoires et auto-immunes. En effet, nous allons voir qu'il existe des corrélations entre la présence de cellules exprimant soit le NKG2D soit les NKG2DL et le développement de ces maladies, confortées par des preuves mécanistiques.

Chez l'humain, des études génétiques ont montré un lien entre l'expression de certains allèles des NKG2DL et le développement de l'arthrite rhumatoïde et du psoriasis, appuyant l'implication de la voie NKG2D dans le développement de ces maladies auto-immunes ou inflammatoires (Feng et al., 2009; Kirsten et al., 2009; Pollock et al., 2013).

Les souris NOD modèles du diabète de type I montrent une expression aberrante des RAE-1 et une infiltration de LT CD8 auto-réactifs exprimant le NKG2D (Ogasawara et al., 2004). Dans d'autres modèles murins, une augmentation de l'expression des NKG2DL a également été montrée, les RAE-1 et le H60b pour l'athérosclérose et le RAE-1 pour l'arthrite rhumatoïde (Andersson et al., 2011; Xia et al., 2011). En outre, les souris déficientes pour le NKG2D sont moins susceptibles au développement d'inflammation du foie (Xia et al., 2011). Des patients atteints d'arthrite rhumatoïde ou de la maladie de Crohn présentent une augmentation de LT CD4 exprimant NKG2D et/ou des ligands de la famille des MIC dans les tissus atteints (Allez et al., 2007; Groh et al., 2003).

Plusieurs études montrent que bloquer l'interaction NKG2D-NKG2DL prévient le développement de maladies inflammatoires et/ou la mort cellulaire *in vivo* et *in vitro*. Par exemple, le blocage de NKG2D protège les souris du développement du diabète de type I, de la colite ou de l'arthrite rhumatoïde (Andersson et al., 2011; Ito et al., 2008; Ogasawara et al., 2004).

Dans l'arthrite psoriasique, les patients présentent une augmentation de l'expression de MICA ainsi que de l'IL15 dans le tissu synovial. Cet environnement inflammatoire est lié à une activation aberrante des NK, qui augmentent leurs capacités cytolytiques via NKG2D et la PLCA2 et participent à la pathobiologie de la maladie (Tang et al., 2013). Une étude a mis en évidence que le NKG2D et l'IL15, permettent une augmentation de l'expression d'enzymes, importants pour la synthèse des cystéinyl leukotriènes et de leur récepteur sur des cellules T cytotoxiques intra-épithéliales. Ces derniers sont impliqués dans la mort de cellules cibles de façon TCR indépendante, et participent au développement de la maladie coeliaque (Tang et al., 2015).

Le développement de stratégie thérapeutique ciblant l'interaction NKG2D-NKG2DL pourrait être intéressant à la fois en oncologie et pour les maladies infectieuses, inflammatoires et auto-immunes. La multitude de NKG2DL ayant des régulations et des expressions suivant les pathologies différentes, ainsi que le grand nombre de polymorphes, peuvent être intéressants pour le développement de thérapies ciblées (Carapito and Bahram, 2015).

3.5 NKG2D et ses ligands dans le SNC

L'inoculation de la souche neurotrope JHM du coronavirus « mouse hepatitis virus » (MHV) induit une maladie démyélinisante. Dans ce modèle, l'expression des NKG2DL RAE-1, MULT1 et H60 est augmentée suite à l'infection. De plus, le NKG2D est exprimé sur 90% des LT CD8 infiltrant le parenchyme cérébral (Walsh et al., 2008). Bloquer le NKG2D avec un anticorps monoclonal conduit à une augmentation de la mortalité en raison de la baisse de l'activité cytolytique des LT CD8 envers les cellules infectées par le virus. L'interaction NKG2D-NKG2DL est donc importante pour la défense contre les infections virales du SNC (Walsh et al., 2008). Dans ce même modèle, la transplantation de précurseurs de cellules neurales (PCN), conduit à un rejet des cellules du greffon qui expriment le RAE-1 par les NK via le NKG2D. En outre, après la différenciation des PCN en cellules gliales ou en neurones l'expression de ce ligand est fortement réduite (Weinger et al., 2014). Une équipe a montré que les neurones des ganglions de la racine dorsale, contrairement aux neurones du SNC expriment le NKG2DL RAE-1 et peuvent être lysés par les NK via NKG2D (Backstrom et al., 2003).

Chez l'humain, bloquer le NKG2D diminue la mort, engendrée par les NK, des astrocytes fœtaux en culture primaire (Darlington et al., 2008). De plus, les NKG2DL détecté par un tétramère NKG2D, sont constitutivement exprimés sur les microglies humaines en culture. Leur expression sur ces cellules diminue après stimulation au LPS (Lunemann et al., 2008).

3.4.1 Sclérose en plaques et EAE

Des études génétiques ont mis en évidence une association entre certains allèles de NKG2D et la SEP (Fernandez-Morera et al., 2008b). Dans cette maladie, une étude, menée dans notre laboratoire, a montré que des oligodendrocytes dans les lésions de SEP expriment MICA/B mais pas les oligodendrocytes de cerveaux témoins et que des LT CD8 sont présents dans les lésions à proximité de ces cellules qui expriment les NKG2DL (Saikali et al., 2007). MICA, MICB, ULBP1, ULBP2 et ULBP3 sont également exprimés sur des oligodendrocytes humains en culture primaire. *In vitro*, empêcher l'interaction NKG2D-NKG2DL inhibe la mort des oligodendrocytes humains causée par les LT CD8 ou $\gamma\delta$ ou les NK (Saikali et al.,

2007). De plus, une autre équipe semble montrer que des neurones présents dans les plaques démyélinisantes expriment les MIC, mais leurs marquages ne sont pas convaincants (Fernandez-Morera et al., 2008a). Ils ont également mis en évidence que les patients atteints de la SEP présentent un taux plus élevé de MICB soluble dans leur sérum par rapport aux témoins et plus particulièrement durant les rechutes. Les patients atteints de SEP présentent une sous population de CD4 exprimant NKG2D (moins de 1%) avec des propriétés cytolytiques et un taux élevé de marqueurs de migration et d'activation. Ces cellules sécrètent un taux élevé des cytokines pro-inflammatoires INF γ et IL-17 après stimulation, et ont des propriétés migratoires augmentées dans un modèle *in vitro* de BHE (Ruck et al., 2013).

Dans l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE), un modèle de la SEP, l'ARNm de certains isoformes du RAE-1 est induit au début de la maladie pour atteindre une expression maximale au pic de la maladie dans les macrophages et/ou les microglies (Djelloul et al., 2016). Dans ce modèle, bloquer NKG2D en pré-symptomatique avec un anticorps bloquant ou du NKG2D soluble, décale le début de la maladie et sa sévérité. Par contre, le blocage de NKG2D avec le récepteur soluble après le début des symptômes n'a pas d'effet (Ruck et al., 2013). De plus, les souris déficientes pour NKG2D sont moins susceptibles au développement de l'EAE en condition sous-optimale mais pas en condition optimale. En effet, si les souris sont immunisées avec 20 μ g au lieu de 100 μ g de MOG35-55 alors le début de l'EAE est identique entre les souris Klrk1 $+/+$ et Klrk1 $-/-$ mais le pic et la phase chronique de la maladie est moins sévère chez les souris Klrk1 $-/-$ que les souris Klrk1 $+/+$ (Guerra et al., 2013). *In vitro*, bloquer le NKG2D empêche la mort des oligodendrocytes murins par les LT CD4 activés (Ruck et al., 2013).

Par contre un groupe expose un rôle protecteur de NKG2D, exprimé sur les NK, dans l'EAE. Une première étude montre que la protéine chaperonne de choc thermique 70 (HSP70) permet une tolérance à l'EAE dépendante des NK. HSP70 augmente l'expression de H60, et bloquer H60 ou son récepteur NKG2D induit une perte de la tolérance à l'EAE. L'expression de H60 sur les LT auto-réactifs n'est pas augmentée, suggérant que le mécanisme protecteur ne passe pas par une mort directe des LT auto-réactifs suite à l'interaction H60-NKG2D. Par contre, ils ont montré que les NK altèrent la fonction des cellules dendritiques et que c'est ce mécanisme qui augmente la mort des cellules T auto-réactives. Une seconde étude montre que la HSP70 forme un complexe avec le peptide CLAFHDISPQAPTHFLVIPK (HSP70-

HINT1₃₈₋₅₇) et permet d'augmenter H60 et les molécules adaptatrices DAP10 et DAP12 de NKG2D dans les NK. De plus, ce complexe prévient le développement de l'EAE en supprimant la prolifération des LT et la sécrétion d'IL17, ceci est empêché par le blocage de H60 ou NKG2D mais aussi par la déplétion des NK. Ces deux études démontrent que l'interaction NKG2D-NKG2DL permet de moduler les fonctions immunorégulatrices des NK, importantes pour prévenir l'EAE (Galazka et al., 2014; Galazka et al., 2007).

4.0 La sclérose en plaques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire du système nerveux central caractérisée par une perte de la gaine de myéline, une perte axonale et une activation des cellules gliales. Bien qu'elle ait été décrite pour la première fois au XIII^{ème} siècle et synthétisée en détail par Charcot en 1868, sa cause demeure encore aujourd'hui inconnue. Deux hypothèses se confrontent pour expliquer l'origine de la SEP, on parle des modèles « inside-out » et « outside-in ». Le modèle « inside-out » défend une atteinte primaire dans le SNC au niveau des axones et des oligodendrocytes entraînant une activation du système immunitaire par les débris neuraux libérés. Au contraire, le modèle « outside-in » défend une activation primaire des cellules immunitaires en périphérie, qui infiltrent ensuite le parenchyme cérébral et attaquent les cellules du SNC (Stys et al., 2012).

4.1 Prévalence

La SEP est la maladie neurologique la plus fréquente chez les jeunes adultes, 2,5 millions d'individus sont atteints dans le monde. La maladie est en général diagnostiquée entre 20 et 40 ans (Confavreux and Vukusic, 2006). Elle est plus fréquente chez les femmes que chez les hommes puisqu'environ 3 malades sur 4 sont des femmes (Whitacre et al., 1999). Le gène HLA du CMH de classe II est fortement associé au développement de la SEP et plus particulièrement l'haplotype DRB1*1501, présent dans presque toutes les populations caucasiennes testées (Alcina et al., 2012). D'autres allèles ont été associés à la SEP dans des populations non caucasiennes. On peut notamment retrouver chez les patients atteints de SEP, des polymorphismes des gènes codant pour l'IL-7R, la chaîne alpha de l'IL-2R et bêta du TCR. En outre, le risque augmente lorsqu'il y a une association de plusieurs de ces variants génétiques (Fugger et al., 2009; Seboun et al., 1989). Les études épidémiologiques ont montré

qu'environ 5% des personnes ayant un parent de premier degré touché par la maladie et 25% des jumeaux monozygotes dont le frère ou la sœur est atteint développent la SEP (Dyment et al., 2004). Bien que le bagage génétique soit non négligeable dans la pathogénèse de la SEP, on estime qu'une combinaison de facteurs génétiques et environnementaux est nécessaire au développement de cette maladie. Les facteurs environnementaux incriminés délétères sont, le manque de vitamine D peu présente dans l'alimentation et synthétisée grâce aux rayons UV, la cigarette, les habitudes alimentaires riches en lipide et en sel, des agents infectieux comme le virus d'Epstein-Barr. La prévalence est plus importante dans les pays développés à latitude élevée (Georget et al., 2008). La population canadienne est donc très touchée, avec l'un des plus hauts taux au monde, on estime à 100 000 le nombre de patients au Canada (Statistics Canada, Canadian Community Health Survey (CCHS)). Les flux migratoires ont mis en évidence que les individus qui changent de région ou pays après l'âge de 15 ans gardent la prévalence de leur habitat d'origine. L'inverse est également vrai, les personnes qui migrent avant 15 ans acquièrent la prévalence de leur territoire d'accueil (Milo and Kahana, 2010).

4.2 Symptômes

Les symptômes sont très divers et différents autant dans leur fréquence que dans leur sévérité d'un patient à l'autre (fig. 6). Ils dépendent de la région du système nerveux central atteinte. On peut énumérer les troubles de la vision, une fatigabilité extrême, des troubles de l'équilibre et de la coordination, des raideurs musculaires, des difficultés d'élocution, des troubles vésicaux et intestinaux, une altération de la mémoire des faits récents ainsi qu'une paralysie partielle ou complète (Kister et al., 2013).

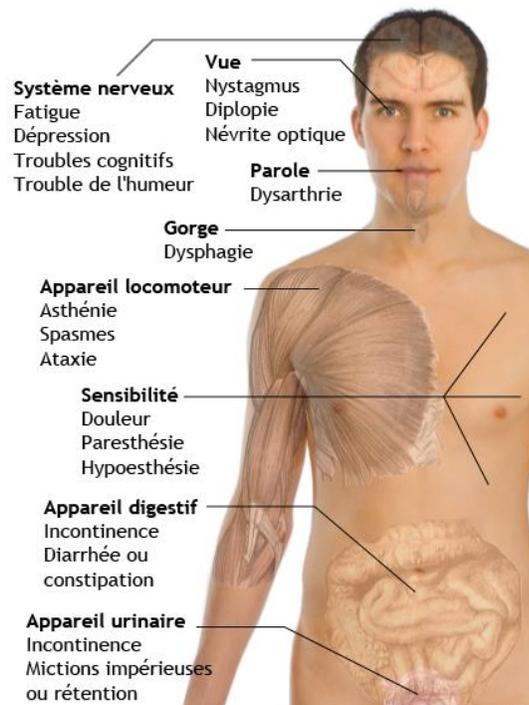


Figure 6: Les symptômes de la sclérose en plaques. Adapté de Mikael Haggstrom. 2014
Journal of Medicine

Environ 80% des patients présentent une forme cyclique de la maladie caractérisée par des poussées et des rémissions totales ou partielles avant de passer en forme progressive dite secondaire avec une détérioration graduelle du handicap. 20% des patients présentent directement une forme progressive dite primaire. La forme cyclique est plus inflammatoire alors que la forme progressive est plus neuro-dégénérative (fig. 7) (Lassmann et al., 2012).

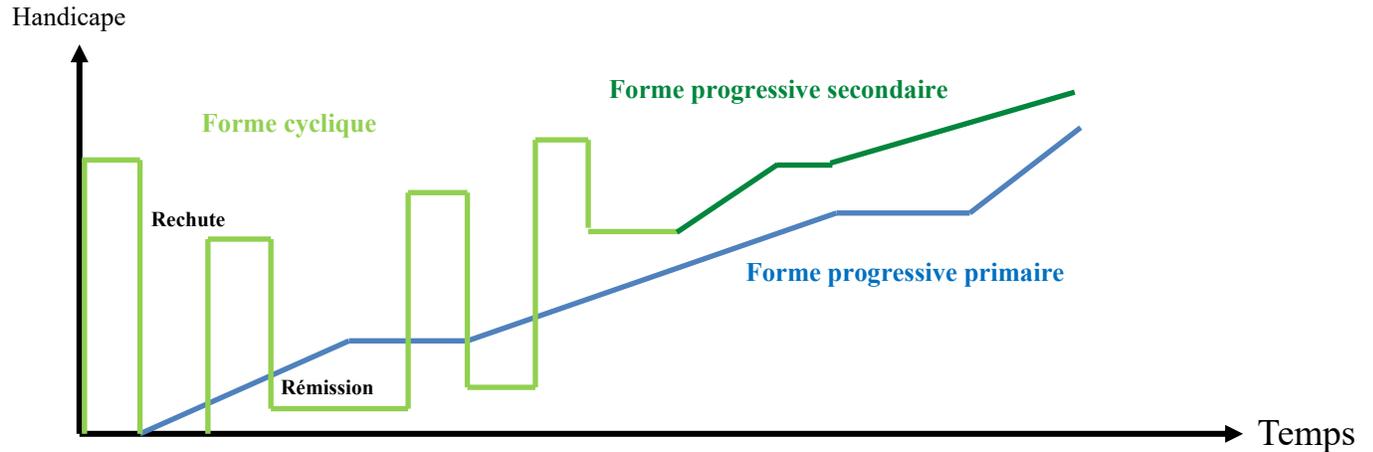


Figure 7: Les différentes formes de la sclérose en plaques. Adapté de Lublin et al., 2014 Neurology

4.3 Caractéristiques anatomopathologiques

Le parenchyme cérébral des patients atteints de la SEP est caractérisé par la présence de plaques de sclérose résultant de tissus cicatrisants remplaçant la gaine de myéline détruite, des lésions focales sont visibles à la fois dans la matière grise et la matière blanche. Les autres spécificités anatomopathologiques du SNC des patients atteints de la SEP sont une infiltration massive de leucocytes ainsi qu'une perte axonale et une activation des microglies et des astrocytes (Lassmann, 2018). Parmi les leucocytes infiltrants on observe les LB et les LT, les plasmocytes et les macrophages. Les infiltrats diffus au niveau des lésions sont principalement des LT CD8 (Babbe et al., 2000; Bsibsi et al., 2014; Frischer et al., 2009). Des facteurs solubles sont produits par les lymphocytes présents dans l'espace périvasculaire et les méninges des patients atteints de SEP. Ils causent de façon directe ou indirecte, par l'activation des microglies, les phénomènes de démyélinisation et de neurodégénérescence observés chez des patients. En outre, la nature de ces facteurs n'est pas encore bien définie (Magliozzi et al., 2007). D'autres caractéristiques des tissus lésionnels sont la présence de dommages mitochondriaux et d'insultes oxydatives, induisant les mécanismes de démyélinisations et de neurodégénérescences, ceci est particulièrement observé dans le SNC

des patients atteints de la forme progressive de la SEP (Fischer et al., 2012). On observe 4 types de lésions corticales (Kidd et al., 1999) :

- Les lésions au niveau de la barrière cortico-subcorticale qui affectent autant la matière grise que la matière blanche ;
- Les petites lésions périvéneuses intracorticales ;
- Les lésions localisées dans la couche subpinale, c'est le type le plus fréquent ;
- Les lésions qui affectent tout le cortex sans passer la barrière matière blanche/matière grise.

Les lésions corticales sont caractérisées par un degré d'inflammation, un oedème, un recrutement des macrophages et une activation microgliales beaucoup moins importants que dans la lésion de la matière blanche. En plus de la démyélinisation, une perte des neurones, des axones, des synapses et des cellules gliales a été mise en évidence dans la matière grise des patients atteints de la SEP. En outre, la remyélinisation est meilleur au niveau du cortex qu'au niveau de la matière blanche (Albert et al., 2007; Peterson et al., 2001; Wegner et al., 2006).

On distingue 4 patrons spécifiques de la maladie. Les patrons 1 et 2 sont de type encéphalomyélite auto-immune, caractérisée par une perte de toutes les protéines de la myéline, des lésions périveineuses et une remyélinisation. La différence entre les patrons 1 et 2 est la présence d'Ig et de protéine du complément dans les lésions du patron 2. Les patrons 3 et 4 sont de type dystrophie d'oligodendrocyte. Le patron 3 présente des oligodendrocytes en apoptose et en nécrose et une perte principalement de la protéine de la myéline MAG alors que le patron 4 présente seulement des oligodendrocytes en nécroses et une perte de toutes les protéines de la myéline. L'ordre décroissant de prévalence des 4 patrons est le patron 2, 3, 1 et 4 (Lucchinetti et al., 1996).

4.4 Diagnostic

Le diagnostic de la SEP se base sur l'étude des antécédents médicaux, l'examen neurologique et l'imagerie par résonance magnétique. Une ponction lombaire peut également être pratiquée afin d'analyser la potentielle présence de bandes oligoclonales dans la LCS. Il est essentiel d'observer des lésions disséminées dans le temps et l'espace pour établir le diagnostic. Les lésions actives sont hyper-intenses en imagerie par résonance magnétique

après injection intraveineuse de gadolinium, alors que les lésions anciennes sont hypo-actives. En effet, le gadolinium est un agent de contraste qui est capable de pénétrer dans le parenchyme cérébral qu'en cas de bris de la BHE (Polman et al., 2011).

4.5 Traitements

Il n'existe actuellement aucun traitement curatif de la SEP mais des thérapies peuvent limiter la progression de la maladie. Les traitements sont principalement proposés pour la forme cyclique et sont peu efficaces pour la forme progressive. On observe trois stratégies de traitements mises au point pour lutter contre la SEP. La première consiste à agir sur les dysfonctionnements du système immunitaire en périphérie (immuno-modulateur), la seconde à bloquer l'entrée des cellules immunitaires au niveau du SNC et la troisième à favoriser la réparation du SNC. Les traitements de première ligne sont les immunomodulateurs, interféron bêta et acétate de glatiramère qui atténuent l'activation des LT et la production de cytokines pro-inflammatoires tout en augmentant la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (Johnson et al., 2000; Ross et al., 2000). Plus précisément, l'IFN β diminue l'expression du CMH de classe 2 ainsi que la production de Th1 et Th17 et permet l'augmentation de la production d'IL10. Il réduit l'infiltration de cellules immunitaires à travers le BHE et pourrait également favoriser la survie et la réparation neuronale en augmentant la production de facteur de croissance (Kieseier, 2011). L'acétate de glatiramère est un polypeptide de synthèse qui de part son analogie avec le MBP permet de limiter l'activation des cellules reconnaissant cette protéine. Il pourrait également avoir un effet sur la réparation de la myéline en augmentant la production de facteur de croissance par les LT (Skihar et al., 2009). La cortisone est également un traitement de première ligne utilisé lors des premiers épisodes d'exacerbation aigu afin de réprimer l'inflammation (Tullman, 2013). Les traitements prescrits lors de formes plus sévères et actives sont le natalizumab et le fingolimod. Le natalizumab est un anticorps monoclonal qui bloque l'infiltration des LT dans le parenchyme cérébral en se liant à la molécule d'adhésion VLA-4 présent sur les lymphocytes (Polman et al., 2006). Le fingolimod bloque la sortie des lymphocytes T et B des organes lymphoïdes secondaires en agissant sur les récepteurs SIPs (Pelletier and Hafler, 2012). Malheureusement l'utilisation du natalizumab, pourtant efficace est accompagnée d'effets secondaires sévères. En effet, l'immuno-surveillance du SNC étant altérée, certains patients développent des leucoencéphalopathies

multifocales progressives induites par un virus affectant les oligodendrocytes et souvent fatal (Clifford et al., 2010). Il existe aussi le diméthylfumarate qui agit sur la voie nrf2 et qui pourrait avoir des propriétés anti-oxydantes protectrices contre les lésions du SNC ; ainsi que le teriflunomide, qui inhibe la déshydrogénase dihydroorotate autrement dit la synthèse des pyrimidines et permet une inhibition de la sécrétion des cytokines pro-inflammatoires et de l'activation des LT (Bomprezzi, 2015; O'Connor et al., 2011). De plus, ces dernières années d'autres médicaments ont été approuvés au Canada. L'ocrelizumab qui bloque le CD20 exprimé par les LB et réduit le nombre de LB qui servent d'APC ; l'alemtuzumab qui bloque le CD52 présent sur les LB et les LT et permet leur déplétion par ADCC et le complément ; la cladribine une adénosine deaminase entraînant l'apoptose des lymphocytes et le daclizumab qui bloque la chaîne alpha du récepteur à l'IL-2 (CD25) et augmente l'activité des NK régulatrices (Baecher-Allan et al., 2018).

4.6 Modèles animaux

4.6.1 Encephalomyélite Auto-immune Expérimentale (EAE)

C'est le modèle qui récapitule le mieux les processus inflammatoires associés au développement de la SEP. De façon intéressante, les souris femelles sont plus susceptibles à l'EAE que les souris mâles comme dans la SEP où plus de femmes sont touchées que d'hommes. Alors que les souris adultes développent la maladie, les jeunes souris (3 semaines) sont résistantes. C'est un modèle robuste avec 90% à 100% des souris immunisées malades (Constantinescu et al., 2011). Par contre, le microbiote commensal influence fortement le développement de la maladie. Les souris traitées avec des antibiotiques ou mises dans un environnement sans germes sont significativement moins malades que celles mises en condition conventionnelle. Ces souris présentent à la fois une baisse des réponses pro-inflammatoires dans le SNC et une augmentation des réponses régulatrices en périphérie (Calvo-Barreiro et al., 2018). On observe 5 stades de la maladie (fig. 8) correspondant à une paralysie progressive ascendante des rongeurs (Miller et al., 2010) :

- Stade 1. : La queue des souris devient souple et retombe lorsqu'elle est levée ;
- Stade 2 : Les souris présentent une ataxie et mettent quelques secondes à se retourner du ventre au dos ;

- Stade 3 : Les souris ont une des pattes arrière paralysée ;
- Stade 3,5 : Les souris ont une des pattes arrière paralysée et l'autre faible ;
- Stade 4 : Les souris ont leurs deux pattes arrière paralysées ;
- Stade 4,5 : Les souris ont leurs deux pattes arrière paralysées et une faiblesse dans les pattes avant ;
- Stade 5 : Les souris sont moribondes et doivent être sacrifiées.

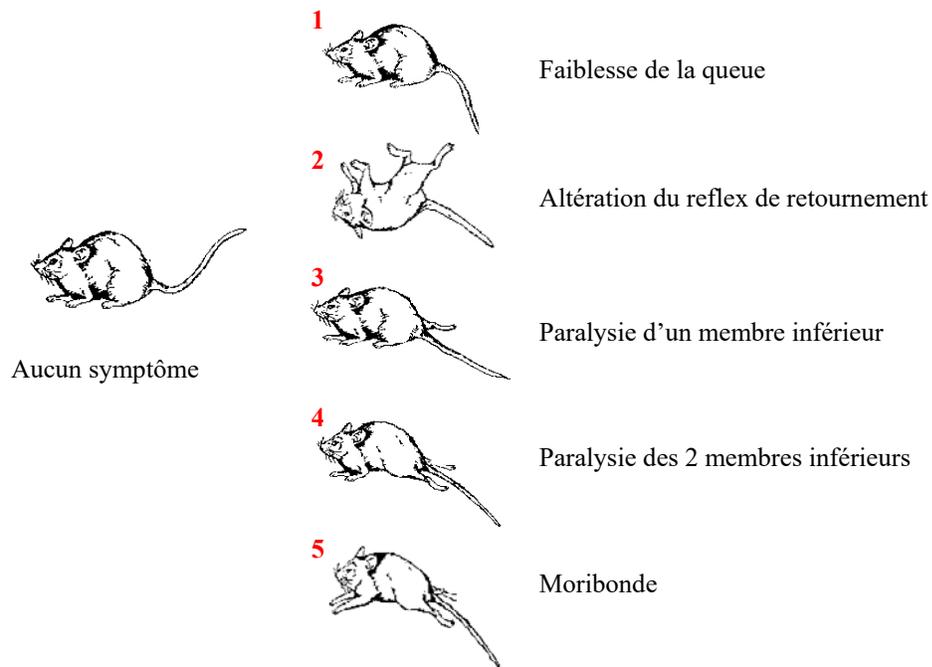


Figure 8 : Les différents stades de l'EAE. Adapté du BartsMS Blog

Il existe des modèles actifs et passifs. Le modèle actif est induit par injection sous cutanée d'une émulsion d'adjuvant complet de Freund (CFA) contenant une haute dose de *Mycobacterium tuberculosis* tuée avec un peptide spécifique de la myéline et de la toxine pertussique injectée sous voie intraveineuse ou intrapéritonéale (PTX) (Stromnes and Goverman, 2006a). Le CFA permet de stimuler le SI, grâce notamment au *Mycobacterium tuberculosis* qu'il contient et qui est un inducteur puissant des cytokines pro-inflammatoires (Constantinescu et al., 2011). La PTX permet d'ouvrir la BHE, mais a aussi une action activatrice sur le SI. Cette toxine promeut, de façon TLR4 dépendante, la production d'IL1 β et

d'IL6 par les cellules stromales ou myéloïdes, facilitant l'entrée des leucocytes dans le parenchyme cérébral. Elle intervient également dans la différenciation des LT CD4 en cellules Th1/Th17 productrices d'IL17A, d'IFN γ et de GM-CSF (Dumas et al., 2014; Ronchi et al., 2016). Le peptide spécifique de la myéline utilisée, diffère suivant les souches de souris. Pour les SJL on injecte le PLP139-151 qui induit une maladie rémittente et pour les C57BL/6 on injecte le MOG 35-55 qui induit une maladie progressive (Mix et al., 2010). Les souris sur fond C57BL/6 ont l'avantage d'être disponibles déficientes pour de multiples gènes, contrairement aux souris SJL. En outre, d'autres souches de souris, comme les BALB/c sont résistantes à l'EAE (Constantinescu et al., 2001).

Pour induire le modèle passif, la première étape est identique (injection de CFA+peptide myéline+PTX) mais les souris sont sacrifiées 8 jours après l'immunisation, avant le début des premiers symptômes, afin de récolter la rate et les ganglions. Les cellules T sont alors ré-activées en culture *in vitro* avec le peptide spécifique de la myéline et un cocktail de cytokines avant d'être ré-injectées à des souris naïves. Le modèle passif est, par exemple, intéressant pour discriminer les rôles de différents types de cellules immunitaires sélectionnés sur colonne magnétique avant l'injection des cellules T activées (Stromnes and Goverman, 2006b).

Il existe également des modèles d'EAE spontanés avec des souris qui expriment un TCR transgénique pour un peptide spécifique de la myéline sur leur LT CD4 ou CD8 (Kuchroo et al., 2002). Des souris exprimant des TCR transgéniques peuvent également être utilisées pour faire des modèles passifs, par exemple une démyélinisation inflammatoire peut être induite par injection de LT CD8 TCR transgéniques pour l'hémagglutinine du virus influenza (HA) à des souris dont les oligodendrocytes expriment la protéine HA (Saxena et al., 2008).

L'EAE classique est caractérisée par des lésions principalement dans la moelle épinière et un ratio Th17/Th1 faible alors que l'EAE atypique est caractérisée par des lésions préférentiellement dans le cerveau conduisant à des symptômes différents (ataxie, hyper-réflexivité, déficit proprioceptif, tendance à tourner sur elle-même et déséquilibre) et un ratio Th17/Th1 élevé (Goverman, 2009).

Les avantages des modèles EAE sont qu'ils permettent l'étude des mécanismes inflammatoires et des bris de la BHE. De façon intéressante, on retrouve des lésions

disséminées dans le SNC, des infiltrats de cellules immunitaires, des activations de cellules gliales et des pertes axonales avec une histologie qui ressemble à ce qu'on trouve chez les patients. Le modèle spontané a l'avantage d'être plus physiologique en évitant l'injection d'adjuvant, de plus, il permet de faire des modèles humanisés. Par contre, les différences de ce modèle par rapport à la SEP sont l'absence d'évolution en forme progressive dégénérative l'induction nécessaire de la maladie pour la majorité des EAE, la localisation des lésions (moelle épinière vs cerveau) et le fait que ce soit principalement les LT CD4 impliqués et retrouvés dans les lésions. L'inconvénient de ce modèle, en plus de ces différences par rapport à la SEP sont la localisation aléatoire des zones d'infiltration et de remyélinisation qui compliquent son étude et le manque de prédiction au niveau des traitements. Par exemple la déplétion des LT CD4 ou l'injection d'IFN γ est protecteur dans l'EAE mais pas chez les patients (Constantinescu et al., 2011).

4.6.2 Toxines

Deux toxines sont fréquemment utilisées, le cuprizone ou la lysolécithine. La cuprizone est un chélateur de cuivre entraînant des lésions démyélinisantes dans le corps calleux et l'hippocampe, elle est donnée dans la nourriture de façon transitoire ou prolongée si le but est d'obtenir une démyélinisation chronique (Torkildsen et al., 2008). La lysolécithine est un détergent membranaire injecté de façon stéréotaxique (Blakemore and Franklin, 2008). Ce sont de bons modèles pour étudier la démyélinisation, les mécanismes de mort et de survie des oligodendrocytes ainsi que les processus de re-myélinisation et la promotion de cette dernière. L'avantage du modèle avec la lysolécithine est qu'il est prédictif au niveau spatiotemporelle et celui du modèle avec la cuprizone est qu'il est possible de faire un modèle chronique (Denic et al., 2011). Même si les lésions, notamment induites par le cuprizone, ressemblent à celles du patron 3 de la SEP décrite précédemment, l'inconvénient de ces modèles est qu'on est loin du mécanisme physiopathologique de la SEP en récapitulant peu le côté inflammatoire de la maladie (Ransohoff, 2012). Cependant, la démyélinisation est exacerbée par les microglies qui s'activent, prolifèrent et migrent vers la zone endommagée après l'administration de cuprizone. Une infiltration de LT est également observée dans ce modèle, mais ne semble pas participer à la démyélinisation puisqu'elle est identique chez les

souris exemptes de lymphocytes matures (RAG-1^{-/-}) (Hiremath et al., 2008; Remington et al., 2007)

4.6.3 Virus

Les deux virus utilisés couramment pour induire une encéphalite inflammatoire aiguë sont le coronavirus murin MHV souche JHM et le picornavirus «Theiler murine encephalomyelitis virus» (TMEV). Le MHV est associé à une démyélinisation puis une remyélinisation lente et le TMEV à une démyélinisation chronique progressive avec perte axonale (Denic et al., 2011). L'avantage de ces modèles est que la maladie se développe spontanément après l'infection, le rapprochant en ce sens de la SEP et du facteur de risque viral associé au développement de la maladie (Epstein Barr Virus). Ce sont des modèles avec une réponse plus importante des LT CD8 donc intéressants pour étudier ce sous type cellulaire. Dans le modèle MHV, on observe une démyélinisation en absence d'expression détectable du pathogène donnant des pistes pour comprendre la SEP (Lassmann and Bradl, 2017). Le modèle TMEV aide quant à lui à explorer comment un virus peut induire l'auto-immunité autrement dit à comprendre les mécanismes de mimétisme moléculaire ayant lieu suite à l'infection du SNC. En effet, l'infection par le virus TMEV active des LT ayant des réactions croisées avec des auto-antigènes, et permet le développement de la maladie auto-immune. Ainsi, l'infection avec un TMEV non pathogénique contenant une insertion de la protéine de la myéline PLP139-151 dans la région codante, induit une maladie plus précoce que l'infection avec un TMEV sauvage (Olson et al., 2001). La limite du modèle TMEV est que l'infection virale persistante déclenchant la maladie n'a pas été démontrée chez les patients. Les études utilisant ces deux modèles viraux, sont également limitées, du fait que les souches de souris présentant une démyélinisation sont restreintes. Par exemple, les souris SJL sont résistantes à la souche JHM du MHV et seules les souris avec l'haplotype CMH H-2^{q, r, s, v, f, p} sont susceptibles au TMEV (Mecha et al., 2013).

4.7 Revue: “Multiple sclerosis and T lymphocytes: an entangled story”

Pour compléter ce chapitre 4 sur la SEP, et afin de rentrer plus en détail dans les mécanismes immunitaires impliqués dans cette maladie du SNC, ci-dessous est inséré une revue dont je suis la première auteure. Cette revue met l'accent sur l'état actuel des

connaissances concernant les LT dans la SEP que j'ai étudié au cours de ma thèse. Ainsi, elle me permet d'aborder les thèmes suivants :

- Les LT, cellules clefs des réponses immunitaires adaptatives
- Les LT auto-réactifs reconnaissant les antigènes du SNC
- L'extravasation des LT vers le SNC
- Les LT Th1 et Th17 dans la SEP et l'EAE
- Les LT CD8 dans la SEP et l'EAE
- Les LT régulateurs CD4 et CD8 dans la SEP et l'EAE
- Le microbiote intestinal et la susceptibilité pour la SEP et l'EAE
- Les interactions entre les LT et les cellules gliales

Multiple sclerosis and T lymphocytes: an entangled story

J Neuroimmune Pharmacol. 2015 Dec;10(4):528-46. doi: 10.1007/s11481-015-9614-0. Epub 2015 May 7.

Laurine Legroux and Nathalie Arbour

Department of Neurosciences Université de Montréal, CRCHUM 900 Saint-Denis Street,
Montreal, QC, Canada, H2X0A9

Keywords:

Central nervous system, T lymphocytes, neuroinflammation, demyelination, neurodegeneration, autoimmunity.

RÉSUMÉ

Français : La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire prototypique du système nerveux central (SNC) caractérisée par des aires de démyélinisation multifocales, des dommages axonaux, une activation des cellules gliales et une infiltration de cellules immunitaires. Malgré des années de recherche intensive, l'étiologie de cette maladie neurologique reste à élucider. Néanmoins, l'abondance des cellules immunitaires telles que les lymphocytes T et leurs produits dans les lésions du SNC des patients atteints de la SEP supportent l'idée que la SEP est une maladie causée en partie par des cellules immunitaires. Un important ensemble de preuves recueillies à partir d'animaux modèles de la SEP telles que l'Encéphalomyélite Autoimmune Expérimentale (EAE), pointe la contribution centrale des lymphocytes T CD4 dans la pathogénèse de la maladie. A la fois les lymphocytes T CD4 Th1 (qui produisent de l'interféron- γ) et Th17 (qui produisent l'interleukine 17) ciblant des auto-antigènes du SNC ont été impliqués dans la pathobiologie de la SEP et de l'EAE. De plus, plusieurs publications suggèrent que les lymphocytes T CD8 participent aussi au développement des lésions de SEP. La migration des lymphocytes T activés de la périphérie dans le SNC a été identifiée comme une étape cruciale dans la formation des lésions de SEP. Plusieurs facteurs promeuvent une telle extravasation des cellules T incluant : des molécules (ex : molécules d'adhésion cellulaire) impliquées dans les interactions des cellules T avec la barrière hémato-encéphalique et les chimiokines produites par les cellules neurales. Finalement, une fois dans le SNC, les lymphocytes T ont besoin d'être réactivés par des cellules présentatrices d'antigènes locales avant d'entrer dans le parenchyme où ils pourront initier les dommages. Davantage d'investigations seront nécessaires pour élucider l'impact des facteurs environnementaux (ex : le microbiote intestinale) et les propriétés intrinsèques du SNC (ex : activation microgliale) sur cette maladie neurologique inflammatoire.

SUMMARY

Multiple sclerosis (MS) is the prototypic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) characterized by multifocal areas of demyelination, axonal damage, activation of glial cells, and immune cell infiltration. Despite intensive years of research, the etiology of this neurological disorder remains elusive. Nevertheless, the abundance of immune cells such as T lymphocytes and their products in CNS lesions of MS patients supports the notion that MS is an immune-mediated disorder. An important body of evidence gathered from MS animal models such as experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), points to the central contribution of CD4 T lymphocytes in disease pathogenesis. Both Th1 (producing interferon- γ) and Th17 (producing interleukin 17) CD4 T lymphocytes targeting CNS self-antigens have been implicated in MS and EAE pathobiology. Moreover, several publications suggest that CD8 T lymphocytes also participate in the development of MS lesions. The migration of activated T lymphocytes from the periphery into the CNS has been identified as a crucial step in the formation of MS lesions. Several factors promote such T cell extravasation including: molecules (e.g. cell adhesion molecules) implicated in the T cell-blood brain barrier interaction, and chemokines produced by neural cells. Finally, once in the CNS, T lymphocytes need to be reactivated by local antigen presenting cells prior to enter the parenchyma where they can initiate damage. Further investigations will be necessary to elucidate the impact of environmental factors (e.g. gut microbiota) and CNS intrinsic properties (e.g. microglial activation) on this inflammatory neurological disease.

APPORT DES AUTEURS AU MANUSCRIT

J'ai contribué en grande partie à la rédaction de cette revue et ai fait la figure incluse dans cette publication. La Dre Nathalie Arbour a entièrement relu, bonifié et corrigé le texte.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is considered the prototypic inflammatory disease of the central nervous system (CNS). This neurological disorder affects over 2 million people worldwide (Multiple Sclerosis International Federation, 2013). MS is clinically characterized by recurrent and transient bouts of handicap, including loss of vision, balance and mobility, and by painful sensory symptoms. An important proportion of patients with MS will experience a steady progression of handicap over several years, which can lead to extreme fatigue, cognition impairment, and paralysis. This chronic neurological disease has enormous physical, psychosocial and economic burdens not only to the patients but also to their families, as MS affects young adults at the peak of their active life. Lesions observed in the CNS of MS patients are characterized by multifocal areas of myelin sheath destruction, oligodendrocyte death, axonal and neuronal damage, and activation of glial cells. Despite decades of intense research, the etiology of this disabling disease remains unresolved. Nonetheless, the MS research community largely agrees that complex interactions between environmental factors and genes lead to the inflammatory process in the CNS. Indeed, both environmental factors and genetics have been shown to influence the susceptibility as well as the development of MS (Koch et al., 2013). A vast body of evidence gathered from both MS patients and animal models points to the fundamental role of the immune system in disease pathogenesis (Wu and Alvarez, 2011). Genetic linkage analyses and more recent genome-wide association studies of MS have uncovered multiple disease associated variants in genes related to immune functions (Sawcer et al., 2014). In addition, cells of the immune system such as macrophages and T lymphocytes and their products are detected with abundance in MS lesions and in the cerebrospinal fluid (CSF) of patients with MS (Wu and Alvarez, 2011). Furthermore, immunosuppressive or immunomodulatory therapies have been shown to ameliorate disease course and clinical outcomes of MS (Cross and Naismith, 2014). Finally, it is well documented that activation of myelin-specific T lymphocytes is sufficient to induce experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), the most common animal model of MS. This review summarizes the current knowledge on the involvement of T lymphocytes in the pathobiology of both MS and its animal models.

T lymphocytes: key cells of the adaptive immune responses

Defense against pathogens is provided by the immune system, which comprises two well integrated and complementary arms: the innate immunity and the adaptive immunity. While the innate immune system delivers an early and rapid response, the adaptive immune system develops a response that is highly specific to the encountered infectious agents and enhanced with subsequent pathogen exposures. B and T lymphocytes mediate the adaptive immune responses and provide long-term protection. Immature T lymphocytes are subjected to stringent positive and negative selection and maturation in the thymus prior to exit in the periphery as naïve mature T cells. The main T cell subsets are: CD4 T lymphocytes, also called helper T cells (Th), and CD8 T lymphocytes, also known as cytotoxic T cells (Tc). CD4 T lymphocytes coordinate numerous immune responses and CD8 T lymphocytes play key roles in controlling intracellular pathogens but also neoplastic cells. T lymphocytes express on their surface the T cell receptor (TCR) complex composed of the highly variable antigen binding TCR and the CD3 signaling proteins. Via this TCR complex, CD4 T lymphocytes recognize antigens that are presented by the major histocompatibility complex (MHC) class II molecules, whereas CD8 T lymphocytes recognize antigens presented by MHC class I molecules. The activation and differentiation of naïve T lymphocytes into activated cells require at least two signals delivered by professional antigen presenting cells (APCs): 1- engagement of the TCR recognizing a peptide-MHC complex; 2- interaction of the co-activating receptor (e.g. CD28) with a co-activating ligand (e.g. CD80, CD86). Such efficient APC-T cell interaction induces a complex cascade of intracellular signaling that triggers the maturation (change in the expression profile of surface and intracellular molecules), proliferation and production of immune mediators (e.g. cytokines) by T lymphocytes.

Specific environmental cues such as cytokines secreted by APCs shape the differentiation of T lymphocytes into specific subsets, each characterized by distinct attributes (transcription factors, cytokines, chemokine receptors, etc.). Based on their cytokine secretion profile, three main subsets of Th and Tc lymphocytes have been described: Th1/Tc1 (e.g. interferon- γ (IFN γ), tumor necrosis factor (TNF)), Th2/Tc2 (e.g. interleukin (IL)-4, IL-5, IL-13), and Th17/Tc17 (e.g. IL-17, IL-21, and IL-22) (Mittrucker et al., 2014; Raphael et al., 2014). Th1 and Tc1 lymphocytes are key components of cell-mediated responses providing immunity to intracellular pathogens. While Th1 cells stimulate phagocyte-mediated functions,

Tc1 cells can directly lyse infected cells by several mechanisms including the release of lytic enzymes (perforin, granzyme). In contrast, Th2 and Tc2 cells play an important role in humoral-mediated immunity. Cytokines (e.g. IL-4) produced by these cells promote the differentiation and maturation of B lymphocytes and the production of antibodies. Finally, Th17/Tc17 cells provide protection against certain bacterial and fungal infections; they favor the recruitment of neutrophils and the activation of innate immune cells. Other effector T cell subpopulations (e.g. Th9, Th22, etc.) as well as regulatory CD4 and CD8 T cell subsets have been documented (Mittrucker et al., 2014; Raphael et al., 2014). The diversity of T lymphocyte subsets and their associated functions illustrates the flexibility and competence of the immune system to efficiently respond to a great variety of pathogens and threats. Following their activation, T lymphocytes migrate into peripheral organs to mediate the immunosurveillance. Finally, a portion of activated T lymphocytes survives and persists as central or effector memory lymphocytes; these memory cells confer long-term protection with enhanced responses upon subsequent challenges. Unfortunately, activated T cells not only control infections and tumors but they can also contribute to pathological processes.

Auto-reactive T lymphocytes recognizing CNS antigens

Despite thymic negative selection, the mature T cell repertoire of healthy humans includes T lymphocytes recognizing self-antigens (Walker and Abbas, 2002). CD4 and CD8 T lymphocytes reactive to myelin antigens [e.g. myelin basic protein (MBP), proteolipid protein (PLP), and myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)], or neuronal antigens (e.g. neurofilament light protein), were found in similar or elevated proportion in the blood and the CSF of patients with MS as compared to healthy controls (Berthelot et al., 2008; Chou et al., 1992; Crawford et al., 2004; Elong Ngonu et al., 2012; Huizinga et al., 2009; Liblau et al., 1991; Ota et al., 1990; Sun et al., 1991; Zhang et al., 1994). Nonetheless, a notable number of publications advocate that myelin specific T cells obtained from MS patients display altered characteristics compared to those detected in healthy donors: an enhanced frequency of high-avidity T cells, an activated phenotype (Allegretta et al., 1990; Bielekova et al., 2004; Chou et al., 1992; Vandevyver et al., 1995; Zhang et al., 1994), and an increased production of pro-inflammatory cytokines (IL-2, IFN- γ , and TNF) (Sharief and Thompson, 1993; Strunk et al., 2000; Zang et al., 2004). Injection of altered myelin peptides, which can compete with native

myelin peptides and consequently alter the activation of myelin-reactive T cells, was shown to protect from EAE development (Anderton et al., 1999; Gaur et al., 1997; Genain and Zamvil, 2000; Nicholson et al., 1995). Subsequently, scientists rationalized that such antigen specific immunotherapy could potentially be beneficial to MS patients (Genain and Zamvil, 2000). In an attempt to decrease pro-inflammatory MBP-specific T cells, MS patients were injected with an altered MBP peptide. Regrettably, in a subgroup of patients, such treatment enhanced MBP reactive Th1 responses, triggered the development of new CNS inflammatory lesions [as detected by magnetic resonance imaging (MRI)], and caused clinical relapses (Bielekova et al., 2000). The dramatic outcome of this clinical trial provided the direct *in vivo* evidence that activation of human myelin reactive T lymphocytes in the periphery can lead to CNS damage in patients with MS.

Multiple lines of evidence collected from EAE models established that myelin-specific T lymphocytes that have been activated in the periphery can induce a CNS demyelinating disease. Indeed, active immunization with myelin or immuno-dominant myelin peptides emulsified in complete Freund's adjuvant can trigger the development of EAE in various animal species (Kabat et al., 1951; Rivers et al., 1933; Stromnes and Goverman, 2006a). Similarly, the adoptive transfer via peripheral routes (intraperitoneal or intravenous) of activated myelin specific CD4 or CD8 T lymphocytes is sufficient to induce EAE in naïve recipients (Fletcher et al., 2010; Mars et al., 2011; Stromnes and Goverman, 2006b). Furthermore, activation of T lymphocytes recognizing myelin epitopes that are distinct from the first targeted antigen, a phenomenon coined as epitope spreading, has been shown to trigger EAE relapses (Baxter, 2007; McMahon et al., 2005; McRae et al., 1995). Accordingly, different groups have elegantly demonstrated that induction of immune tolerance to myelin peptides can prevent the emergence of relapses in EAE models (Baxter, 2007; Vanderlugt et al., 2000; Yu et al., 1996). Collectively, these results support the notion that myelin specific T cells are implicated not only in disease initiation but also in disease progression. Clinical trials in MS patients are currently ongoing in an attempt to induce tolerance to several myelin epitopes; whether such approaches will lead to clinical benefits has yet to be demonstrated (Lutterotti and Martin, 2014).

The detection of CNS-specific T lymphocytes exhibiting an activated phenotype, especially in patients with MS, suggests that these T lymphocytes had previous interactions

with professional APC efficiently presenting CNS-derived antigens. In contrast to most organs, the brain and spinal cord do not contain defined lymphatic channels; nevertheless, lymphatic drainage for the CSF and the interstitial fluid of the brain parenchyma to the cervical lymph nodes does take place (Laman and Weller, 2013). Professional APCs such as dendritic cells have been shown to travel from the CNS via the rostral migratory stream to the cervical lymph nodes where peripheral T cells could encounter CNS antigens (Mohammad et al., 2014). Mature APCs that have engulfed myelin or neuronal antigens were detected in cervical lymph nodes obtained from MS patients and animals (marmosets and mice) affected with EAE, implying that these APCs are positioned to efficiently activate T lymphocytes (Figure 1) (de Vos et al., 2002; van Zwam et al., 2009b). Moreover, extracellular myelin particles were preferentially detected in the meninges and perivascular spaces of MS patients compared to controls (Kooi et al., 2009); whether these soluble antigens are eventually phagocytized and presented to myelin specific T cells is still unknown. It has been shown that transgenic mice expressing a myelin specific TCR can spontaneously develop EAE symptoms and that these self-reactive T cells were first activated in the cervical lymph nodes where some CNS antigens are continuously presented (Goverman, 2009). Recently published data support the notion that under normal physiological conditions, oligodendrocyte specific antigens are presented to T cells in secondary lymphoid organs (Harris et al., 2014). Moreover, CD8 T lymphocytes that were activated within cervical lymph nodes by APCs presenting CNS antigens were shown to acquire specific integrin (e.g. CD103) that guided them back preferentially to the brain where the antigens were originally collected (Calzascia et al., 2005; Masson et al., 2007). Results obtained using intravital two-photon imaging elegantly demonstrated that activated T cells migrated from blood vessels to the CNS under inflamed conditions regardless of their antigen specificity. In contrast, T cells were licensed to enter the parenchyma only following their reactivation by local APCs presenting their cognate antigen (Bartholomaeus et al., 2009). Notably, an important proportion of T cells detected in MS lesions (Kivisakk et al., 2004), or CD8 T cells observed in CSF from MS patients (Ifergan et al., 2011; Jilek et al., 2007) lacks CCR7. As loss of this chemokine receptor (CCR7) on T cells is associated with an effector memory phenotype (Sallusto et al., 2004), these observations suggest that such effector T cells are enriched in the inflamed CNS of MS patients. It is well established that several APCs present in human and mouse lesions can locally reactivate T

cells (Figure 1) including macrophages, microglia, and dendritic cells (Frohman et al., 2006; Greter et al., 2005); more recently, B cells were shown to contribute to such T cell reactivation in EAE mice (Pierson et al., 2014) (Figure 1). Moreover, the activation of subsequent waves of CNS-reactive T lymphocytes involved in disease relapse and perpetuation could take place either in lymph nodes and/or within the inflamed CNS. In a chronic EAE model, the relapse severity was reduced following the removal of CNS draining lymph nodes (van Zwam et al., 2009a). In addition, a subpopulation of dendritic cells detected within the inflamed brain of EAE mice efficiently activated naïve myelin-specific CD8 T lymphocytes (Ji et al., 2013). Collectively, these results indicate that CNS specific T cells can be activated either locally in the CNS or in lymphoid organs.

A vast body of evidence demonstrated that infectious agents can trigger, in both humans and mice, the activation of T lymphocytes that recognize both a self-antigen such as myelin peptide and a microbial peptide, a phenomenon referred as molecular mimicry (Chastain and Miller, 2012; Fujinami and Oldstone, 1985; Hemmer et al., 1997; Olson et al., 2001; Talbot et al., 1996; Wucherpfennig and Strominger, 1995). Moreover, self-molecular mimicry can also participate in CNS autoimmunity. Indeed, multiple clones of CD4 T lymphocytes expanded from MOG₃₅₋₅₅ immunized mice and carrying a single TCR have been shown to recognize both the myelin antigen (MOG₃₅₋₅₅) and an axonal antigen (neurofilament) (Krishnamoorthy et al., 2009; Lucca et al., 2014). Moreover, both self-antigen recognitions contributed to the observed CNS damage (Krishnamoorthy et al., 2009). Finally, the capacity of T cells to recognize multiple epitopes could also arise from dual T cells, which express two TCRs. Goverman and colleagues have demonstrated that a viral infection activated dual CD8 T cells recognizing both a viral antigen and a myelin antigen and consequently triggered CNS autoimmunity (Ji et al., 2010). A better understanding of the mechanisms implicated in the activation of myelin or neuronal reactive T lymphocytes in the context of MS will be essential to design therapies specifically targeting these detrimental cells.

Extravasation of T lymphocytes to the CNS

The blood brain barrier (BBB) restricts the migration of cells and soluble molecules from the periphery to the CNS and consequently preserves local homeostasis and an optimal environment for neuronal functions (Larochelle et al., 2011). Under normal physiological

conditions, few leukocytes, including T cells, cross the BBB to perform the immune surveillance of the CNS. In contrast, the massive infiltration of pro-inflammatory leukocytes into the CNS represents an early event in the development of MS and EAE lesions (Larochelle et al., 2011) (Figure 1). The different steps of immune cell extravasation include: capture/rolling, activation, firm adhesion, crawling and diapedesis/transmigration (Engelhardt and Ransohoff, 2012). While resting T lymphocytes have a limited capacity to invade the brain or spinal cord, activated T lymphocytes express numerous molecules including chemokine receptors, adhesion molecules, integrins, cytokines, matrix metalloproteinases, and reactive oxygen species that promote their extravasation into the CNS (Larochelle et al., 2011). An important number of studies using EAE models established that myelin-specific T lymphocytes activated in the periphery acquire these molecules and do enter the CNS (Goverman, 2009).

The interaction between cell adhesion molecules (CAMs) expressed by endothelial cells of the BBB (EC-BBB) and their cognate ligands (integrins, CAMs) present on activated leukocytes plays a central role in the transmigration of immune cells into the CNS (Larochelle et al., 2011). Several inflammatory stimuli (e.g. cytokines) can induce or enhance the expression of CAMs by the EC-BBB including: intracellular cell adhesion molecule 1 (ICAM-1), vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1), activated leukocyte cell adhesion molecule (ALCAM), and melanoma cell adhesion molecule (MCAM) (Cayrol et al., 2008; Larochelle et al., 2012; Wong and Dorovini-Zis, 1992, 1995). The efficacy of an antibody (Natalizumab) targeting $\alpha 4$ integrin, which is part of the VCAM-1 cognate ligand, as a treatment for patients with MS underlines the crucial impact of the BBB-leukocyte interaction in the formation of MS lesions (Polman and Killestein, 2006). Unfortunately, patients treated with biological agents widely hampering immune cell extravasation such as Natalizumab, but also Efalizumab, which targets a subunit of ICAM-1 ligand (αL integrin), have an increased risk of severe infections (e.g. JC virus induced progressive multifocal leukoencephalopathy) (Major, 2010). These clinical outcomes emphasize the necessity to develop tools blocking the migration of specific lymphocyte subsets. In EAE models, blockade of either ALCAM or MCAM, which are both up-regulated in MS and EAE lesions, reduced the transmigration of CD4 T lymphocytes and decreased disease severity (Cayrol et al., 2008; Larochelle et al., 2012). Mice deficient for MCAM specifically on endothelial cells developed less severe EAE

accompanied by reduced CNS T cell infiltration (Duan et al., 2013). Moreover, MCAM expression was detected on a subpopulation of activated CD4 T cells producing augmented levels of inflammatory molecules (e.g. IL-17, GM-CSF) (Larochelle et al., 2012) and preferentially migrating across the BBB compared to cells devoid of this molecule (Larochelle et al., 2012; Schneider-Hohendorf et al., 2014). Overall, these publications suggest that molecules present on subsets of inflammatory T cells rather than the widely expressed integrins (e.g. α L integrin, α 4 integrin) could represent valid therapeutic targets.

Several groups have investigated the impact of chemokines and their receptors on the capacity of T cells to invade the CNS in the context of MS and its animal models (Cheng and Chen, 2014). It is well established that activated T lymphocytes up-regulate specific chemokine receptors that will influence their migratory patterns (Griffith et al., 2014). Both human and mouse Th17 cells have been shown to preferentially express CCR6, a chemokine receptor for CCL20, a chemokine present in abundance in the choroid plexus under normal physiological and MS inflamed conditions (Reboldi et al., 2009). But the role of CCR6 in CNS inflammation is still unresolved; conflicting results indicated that CCR6 deficient mice were either resistant to EAE (Reboldi et al. 2009) or exhibited more severe EAE (Elhofy et al., 2009; Villares et al., 2009). A recent publication suggests that the regional chemokine profile influences the infiltration of leukocytes within specific CNS areas and consequently shapes the clinical EAE symptoms (Stoolman et al., 2014). In EAE mice exhibiting clinical symptoms related to brainstem or cerebellar lesions, CXCL2 was indeed elevated in the brainstem. In contrast, CCL2 was increased in the spinal cord of EAE mice having typical ascending paralysis symptoms associated with spinal cord immune cell infiltration (Stoolman et al., 2014). Moreover, another group showed that following EAE induction in the absence of astrocyte-derived CCL2, the total number of CD4 T lymphocytes in the inflamed CNS was similar to controls, however, these T cells did not enter the parenchymal space and were confined to the spinal cord perivascular area (Moreno et al., 2014). These results support the notion that CNS-cell derived chemokines can shape the migratory pattern of leukocytes including activated T cells. Additional investigations will be necessary to elucidate the contribution of specific chemokines and their receptors especially given their impact on multiple cell types and their various functions.

Th1 vs. Th17 lymphocytes in MS and EAE

Numerous groups documented that activated myelin specific CD4 T cells secreting IFN γ are sufficient to transfer disease into naïve mice (Fletcher et al., 2010; Lovett-Racke et al., 2011). Similarly, injection of IFN γ to patients with MS caused aggravated symptoms (Panitch et al., 1987a; Panitch et al., 1987b). These key observations were the impetus for the concept that myelin specific IFN γ -producing Th1 cells induce the demyelinating disease in both human MS patients and its animal models. But publications in the 1990s refuted the key role of IFN γ -producing cells in disease pathogenesis. Injection of antibodies blocking IFN γ augmented EAE disease severity (Lublin et al., 1993). Moreover, EAE induction into IFN γ or IFN γ receptor deficient mice caused a more severe disease course than in wild type controls (Ferber et al., 1996; Willenborg et al., 1996). A new subset of CD4 T lymphocytes was subsequently identified and named Th17 cells as these lymphocytes produce IL-17A and IL-17F amongst many other cytokines (e.g. IL-21, IL-22). As demonstrated for Th1 cells, the adoptive transfer of activated myelin-specific Th17 lymphocytes can induce EAE in naïve recipient mice (Kroenke et al., 2008; Langrish et al., 2005; Stromnes et al., 2008). However, the signature cytokines secreted by Th17 cells are dispensable for EAE induction; indeed, mice deficient for IL-17, IL-21 or IL-22 were still susceptible to disease (Codarri et al., 2013; Haak et al., 2009; Kreymborg et al., 2007; Sonderegger et al., 2008). The more recent studies pinpoint the crucial role of granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF) in T cell-mediated autoimmune CNS inflammation (Codarri et al., 2013). This cytokine can be secreted by both myelin specific activated Th1 and Th17 lymphocytes; GM-CSF deficient mice were resistant to the induction of EAE; injection of this cytokine exacerbated disease symptoms whereas administration of blocking antibodies even after disease onset diminished disease severity (Codarri et al., 2011; El-Behi et al., 2011; McQualter et al., 2001). Notably, the adoptive transfer of not only Th1 or Th17 encephalitogenic CD4 T cells can induce EAE but Th9 myelin specific CD4 T cells, which are characterized by the secretion of IL-9 and IL-10, can also transfer disease in naïve recipients (Jager et al., 2009).

Pro-inflammatory Th1 and Th17 cytokines are present in elevated amounts in MS patients compared to controls. Indeed, IFN γ , IL-17, IL-22, and GM-CSF were detected in the CSF and CNS lesions of MS patients, especially during the active phase of the disease (Carrieri et al., 1998; Kebir et al., 2009; Mellergard et al., 2010; Monteyne et al., 1999). In

fact, most T lymphocytes in acute and chronic MS lesions express IL-17 (Kebir et al., 2007; Tzartos et al., 2008). Activated CD4 T cells simultaneously producing IL-17 and IFN γ were preferentially expanded from blood samples obtained from MS patients during a relapse; these double producing cells had a greater capacity to cross the human BBB and were detectable in post-mortem MS brain tissues (Kebir et al., 2009). Moreover, IL-12 and IL-23, which are key cytokines involved in the differentiation of Th1 and/or Th17 cell subsets, are more abundant in the CSF and/or CNS of MS patients compared to controls (Li et al., 2007; Link, 1998). Although the injection of an antibody targeting the shared p40 subunit of IL-12 and IL-23 provided significant benefits to patients affected with autoimmune diseases (e.g. psoriasis) (Kumar et al., 2013), such strategy was not successful in MS patients (Segal et al., 2008; Vollmer et al., 2011). Recently, a phase Ib/IIa clinical trial evaluating the impact of an antibody targeting GM-CSF in patients with rheumatoid arthritis patients has shown some efficacy (Behrens et al., 2014). Whether any therapies specifically blocking cytokines such as GM-CSF, could be beneficial in MS patients warrant further investigations.

Observations in EAE models indicate that the relative predominance of Th1 vs. Th17 immune responses influences the CNS localization of the induced inflammation (Pierson et al., 2012). Robust Th1 responses producing elevated levels of IFN γ induced an important immune cell infiltration in the spinal cord and the classical EAE symptoms (e.g. flaccid tail, hindlimb paralysis) (Stromnes et al., 2008). In contrast, encephalitogenic T cells secreting high IL-17 levels but low IFN γ levels, infiltrated preferentially the brain parenchyma and induced the atypical EAE symptoms (e.g. head tilt, spinning and axial rotation) (Stromnes et al., 2008). These distinct lesion patterns were confirmed in a different mouse strain; indeed the adoptive transfer of Th1, Th17 or Th9 encephalitogenic cells also induced CNS lesions with distinct patterns (Jager et al., 2009). Numerous factors can prompt encephalitogenic T lymphocytes to preferentially infiltrate one particular CNS area including genetic background, myelin epitope targeted, cytokines provided by professional APCs, local CNS chemokine production and cytokine receptor expression (Pierson et al., 2012). Importantly, the predominance of either Th1 or Th17 responses in MS patients has been implicated in disease heterogeneity with variations in clinical course, response to immunomodulators and localization of CNS lesions (Axtell et al., 2010; Axtell et al., 2013; Pierson et al., 2012). Finally, an increasing body of evidence gathered from mouse models and human studies demonstrates the plasticity of

activated and memory T cell subsets; the commitment of activated T cells to specific functions and characteristics (cytokines, transcription factors, etc) associated with a particular T cell subset has been shown to be not irreversible (Geginat et al., 2014). For example, one group used a fate tracking system to reveal that during EAE, a subgroup of Th17 cells stopped producing IL-17 and secreted instead IFN γ (Hirota et al., 2011). Although the key roles of Th1 and Th17 CD4 lymphocytes in the initiation of MS and EAE are well established (Chen et al., 2006; Cua et al., 2003; Kebir et al., 2009; Kebir et al., 2007; Stromnes et al., 2008), the mechanisms whereby these cells contribute to the pathogenesis of these demyelinating diseases are not completely resolved. Finally, other CD4 T cell subsets demonstrating cytotoxic properties can also contribute to the tissue damage. We demonstrated that the proportion of CD4 T lymphocytes expressing NKG2C as well as other markers (e.g. CD56, NKG2D, granzyme B) was elevated in the peripheral blood of MS patients compared to controls (Zaguia et al., 2013). Moreover, these NKG2C-expressing CD4 T cells were present in MS lesions and could kill human oligodendrocytes, which express HLA-E the cognate ligand of NKG2C (Zaguia et al., 2013). Additional investigations are deemed essential to elucidate the contribution of the numerous immune molecules and mechanisms used by CD4 T lymphocytes to injure neural cells (Pierson et al., 2012).

Despite the imposing body of evidence gathered from EAE models supporting the essential role of CD4 T lymphocytes in the development of MS (Fletcher et al., 2010), results from clinical trials demonstrated that the picture is far more complex. While an anti-CD4 depleting antibody therapy did not produce any clinical benefits to patients with MS (Lindsey et al., 1994; Llewellyn-Smith et al., 1997; Rep et al., 1997; van Oosten et al., 1997), a more global immunosuppressive approach such as an anti-CD52 antibody (Alemtuzumab), which dramatically reduces the number of most lymphocytes, successfully decreased the number of relapses and disease progression of MS patients (Jones et al., 2010). The emerging appreciation of the contribution of other lymphocyte subsets in MS pathogenesis warrants further investigations and will most likely provide a more accurate understanding of this multifaceted disease.

CD8 T lymphocytes in MS and its animal models

An increasing body of evidence substantiates the notion that CD8 T lymphocytes actively

partake in the CNS injury observed in patients with MS (Mars et al., 2011). Several groups have documented the presence of activated CD8 T lymphocytes in perivascular and parenchymal MS lesions (Figure 1); their number reaches or surpasses that of CD4 T cells (Babbe et al., 2000; Frischer et al., 2009; Gay et al., 1997; Hauser et al., 1986; Junker et al., 2007; Lassmann, 2004; Neumann et al., 2002). CD8 T lymphocytes were even detected in early stages of cortical demyelinating MS lesions (Lucchinetti et al., 2011). IL-17 producing CD8 T lymphocytes (i.e. Tc17) have been shown to be enriched especially in active MS lesions (Kebir et al., 2007; Tzartos et al., 2008). Moreover, we have recently reported that the frequency of MCAM expressing CD8 T cells is elevated in MS patients during relapses and that the proportion of MCAM⁺ CD8 T cells producing IL-17, IFN γ , GM-CSF and TNF is significantly greater than of their MCAM-negative counterparts (Larochelle et al., 2015).

The clonal diversity of T lymphocytes present in a specific compartment can be assessed by spectratyping analysis of the complementarity determining region 3 of the TCR, as each clone expresses a distinct sequence. When the number of distinct T cell clones detected in a specific organ is limited, it implies that these T cells did not inadvertently move into this compartment but rather antigen-specific T lymphocytes preferentially infiltrated and locally expanded. Several groups analyzed the TCR repertoire of CD8 T lymphocytes obtained from the blood, CSF and/or the brain of MS patients. These studies found that the majority of CD8 T lymphocytes recovered from MS lesions belonged to a few clones (Babbe et al., 2000; Junker et al., 2007). Furthermore, using samples obtained from patients studied longitudinally, it has been possible to establish that some CD8 T cell clones detected in MS patients persisted over years in their CNS (CSF and/or tissue) (Jacobsen et al., 2002; Skulina et al., 2004). In sharp contrast, the repertoire of CD4 T cells recovered from the CNS of MS patients has been shown to be heterogeneous (Babbe et al., 2000; Jacobsen et al., 2002; Junker et al., 2007; Skulina et al., 2004). Overall, these reports reinforce the idea that CD8 T lymphocytes present in the CNS of MS patients are not bystander cells but rather have been engaged in active immune responses (Mars et al., 2011). However, the antigens that have been recognized by such infiltrating CD8 T cells and potentially leading to their activation and expansion in the CNS have not been identified.

CD8 T lymphocytes recognize antigens presented by MHC class I molecules. Genetic studies indicated that specific MHC class I alleles either increase (e.g. HLA-A*0301) or

reduce (HLA-A*0201) the risk of developing MS (Brynedal et al., 2007; Fogdell-Hahn et al., 2000; Harbo et al., 2004; Rubio et al., 2007) suggesting that MHC class I alleles could influence the activation of self-reactive CD8 T lymphocytes (Fugger et al., 2009; Mars et al., 2011). Under normal physiological conditions, MHC class I molecules are either undetectable on most CNS cells or expressed at low levels on microglia and endothelial cells. In sharp contrast, inflammatory conditions such as those observed in the CNS of MS patients, can up-regulate these molecules on neurons, oligodendrocytes and astrocytes even in the early phases of the disease (Gobin et al., 2001; Hoftberger et al., 2004; Ransohoff and Estes, 1991). Therefore, we can speculate that activated CD8 T cells can directly target these resident CNS cells. Indeed, several groups identified in MS lesions CD8 T cells in close proximity to oligodendrocytes and demyelinated axons with polarization of their cytolytic granules (Lassmann, 2004; Neumann et al., 2002; Saikali et al., 2007; Wulff et al., 2003); such CD8 T cell detection positively correlated with the extent of axonal damage (Bitsch et al., 2000; Kuhlmann et al., 2002). Moreover, in primary culture systems, activated CD8 T cells were able to injure neuronal axons (Sauer et al., 2013) as well as oligodendrocytes (Jurewicz et al., 1998) in an antigen-MHC class I specific manner. Furthermore, myelin-specific CD8 T cells can induce in mice demyelinating diseases with pathological features reminiscent of the human MS disease (Friese and Fugger, 2005; Huseby et al., 2001; Sun et al., 2001). As well, murine virus-induced models of demyelinating diseases (e.g. Theiler's virus, mouse hepatitis virus) support the involvement of CD8 T cells in demyelination and axonal injury (Howe et al., 2007; Murray et al., 1998; Wu et al., 2000).

Collectively, these results emphasize the contribution of CD8 T lymphocytes to the CNS injury observed in MS patients; however, these cytotoxic T lymphocytes most likely do not act alone. Indeed, experimental data illustrated that both CD4 and CD8 T lymphocytes can work in concert to mediate the autoimmune attack observed in EAE (Huber et al., 2013). Therefore, it is deemed essential to investigate the interplay between CD4 and CD8 T lymphocytes during different stages of MS and its animal models. Such studies will most likely shed light on the complexity and heterogeneity of the immune mechanisms involved in MS pathobiology.

Regulatory CD4 and CD8 T lymphocytes in MS and EAE

Regulatory T lymphocytes are crucial to maintain peripheral tolerance and consequently to prevent autoimmune diseases. These T cells can curtail functions of multiple immune cell subsets including CD4 and CD8 T lymphocytes, natural killer cells (NK) and APCs (e.g. monocytes, macrophages, dendritic cells) via direct contact and secreted molecules (Lowther and Hafler, 2012) (Figure 1). Both CD4 and CD8 T lymphocyte subsets with regulatory properties have been identified (Jadidi-Niaragh and Mirshafiey, 2011). The most studied regulatory CD4 T cell subsets in the context of MS and its animal models are i) the naturally occurring regulatory T cells expressing the transcription factor FoxP3 (Treg) and ii) the regulatory T cells secreting IL-10 (Tr1) (Kleinewietfeld and Hafler, 2014). Several investigations performed in the EAE models established that regulatory T lymphocytes can influence the development and severity of this disease and also favor the recovery phase (Kohm et al., 2002; McGeachy et al., 2005; Olivares-Villagomez et al., 1998). Indeed, the adoptive transfer of FoxP3-expressing Treg into mice conferred protection from EAE induction while depletion of these cells led to a more severe disease course (Kohm et al., 2002; Reddy et al., 2004). Others reported that depletion of T regs did not influence the first EAE remission phase in EAE mice but rather reduced the development of subsequent relapses (Gartner et al., 2006; Jadidi-Niaragh and Mirshafiey, 2011). Similarly, injection of mice with IL-10 producing Tr1-like cells activated via different protocols prevented EAE induction (Barrat et al., 2002; Ding et al., 2006). Numerous groups investigated T regs or Tr1 cells in peripheral blood obtained from MS patients and found that these regulatory cells have impaired regulatory functions and migratory properties, but not necessarily altered frequencies compared to samples taken from healthy donors (Astier et al., 2006; Martinez-Forero et al., 2008; Schneider-Hohendorf et al., 2010; Venken et al., 2008; Viglietta et al., 2004). However, when activated CD4 T cells expressing high levels of both CD25 and CD127 (IL7R α) (Liu et al., 2006; Seddiki et al., 2006) were subtracted and that T regs defined as CD4⁺CD25^{high}CD127^{low} were analyzed the suppressive capacity of Tregs from MS patients was found to be either similar to healthy individuals (Baecher-Allan et al., 2011; Michel et al., 2008; Venken et al., 2008) or reduced only in early MS patients (disease duration less than 10 years) compared to healthy controls (Venken et al., 2008). The potential use of anti-CD127 antibodies, to remove activated T cells but not T regs, is currently under investigation in MS

patients (www.clinicaltrials.gov). Finally, an increasing number of publications indicates that human FOXP3 expressing T regs do not represent an homogenous population; expression of additional transcription factor (e.g. Helios) and surface markers (e.g. TIGIT, FCRL3) has been associated with suppressive capacity (Bin Dhuban et al., 2015; Shevach and Thornton, 2014). Further investigations will be necessary to determine whether specific T reg subsets in MS patients are altered compared to healthy controls.

Interestingly, immunomodulatory treatments for MS patients have been shown to mediate, at least in part, their positive impact by reversing the altered properties of regulatory CD4 T cells in patients (Chiarini et al., 2012; de Andres et al., 2007; Haas et al., 2009; Korporal et al., 2008); these observations suggest that restoring functions of regulatory T cells in patients represents a promising therapeutic option (Kleinewietfeld and Hafler, 2014). For example, interferon- β (IFN β), the first broadly used immunomodulatory therapy to treat MS patients, has been shown to favor the secretion of IL-27 by dendritic cells (Sweeney et al., 2011). Remarkably, monocyte-derived dendritic cells obtained from MS patients that were characterized as IFN β responders produced significantly more IL-27 than those obtained from IFN β non-responders (Sweeney et al., 2011). Similarly, the beneficial immunoregulatory impact of IFN β on EAE has been shown to rely on the induced production of IL-27 (Guo et al., 2008; Shinohara et al., 2008). Notably, IL-27 can reduce EAE severity via several mechanisms including the differentiation of IL-10-producing Tr1 cells (Awasthi et al., 2007; Fitzgerald et al., 2007; Stumhofer et al., 2007; Vasanthakumar and Kallies, 2013).

Subpopulations of CD8 T cells exhibiting regulatory properties have been reported in both humans and animal models although knowledge about these cells is not as extensive as for their CD4 counterparts. Unfortunately, the markers (e.g. CD25, CD122, CD56) or cytokines (IL-10 or TGF β) that have been linked to regulatory CD8 T lymphocytes are not specific to cells with suppressive capacity (Hu et al., 2013; Jiang and Chess, 2004; Willing and Friese, 2012). Almost thirty years ago, impaired CD8 T cell suppressor functions were reported in MS patients compared to healthy controls (Antel et al., 1988; Antel et al., 1986). More recently, CD8 T lymphocytes bearing the capacity to kill myelin specific CD4 T lymphocytes in a HLA-E restricted fashion were described (Correale and Villa, 2008) especially in MS patients treated with glatiramer acetate, a synthetic copolymer of four amino acids (Tennakoon et al., 2006). Similarly to the human data, the capacity of regulatory CD8 T

cells to suppress auto-reactive CD4 T cells via a mechanism involving the Qa-1 molecule, which is the mouse equivalent to the human HLA-E, has been shown in EAE (Jiang et al., 1995; Lu et al., 2008). Karantkar and colleagues described CNS antigen specific CD8 T cells able to suppress the proliferation of effector CD4 T cells; this CD8 T cell-mediated suppression was reduced in samples from MS patients obtained during acute disease exacerbation compared to healthy controls or non-active MS patients (Baughman et al., 2011). Both CD28negative and CD122-expressing CD8 T cell subpopulations have been identified as regulatory cell subsets having the capacity to protect from EAE (Lee et al., 2008b; Najafian et al., 2003; Yu et al., 2014). Overall, these studies indicate that both regulatory CD4 and CD8 T cell subsets can potentially regulate detrimental autoimmune responses observed in active MS patients or in its animal models. However, the mechanisms whereby these cells accomplish such beneficial impact need to be further investigated.

Gut microbiota and the susceptibility to MS and EAE

Microbiota refers to the ensemble of microorganisms that resides in a given anatomical location in the body (Bhargava and Mowry, 2014). Seminal publications have documented the impact of specific gut bacterial communities on the immune system including T lymphocytes. Indeed, commensal microorganisms can promote either inflammatory (Th1 or Th17) or regulatory T cell responses (Atarashi et al., 2013; Atarashi et al., 2011; Kawamoto et al., 2014). In addition to the direct impact of the gut microbiota on bowel-related disorders, a growing body of evidence suggests that these microorganisms can modulate autoimmune disorders in remote organs such as the CNS (Berer and Krishnamoorthy, 2014; Bhargava and Mowry, 2014). Epidemiological, genetics and biological studies have revealed that the susceptibility to MS disease is dictated by an intricate interplay between genes and environmental factors. Recently, the research community has turned the spotlight on the gut commensal microbiota as a potential environmental risk factor for MS (Berer and Krishnamoorthy, 2014; Bhargava and Mowry, 2014).

Modulation of the gut microbiota in mice has been shown to influence the susceptibility to EAE. Following an oral antibiotic regimen, which dramatically reduced gastro-intestinal bacterial populations, mice were found to be significantly less susceptible to EAE induction with delayed onset and attenuated disease severity compared to controls (Lee et al., 2011;

Ochoa-Reparaz et al., 2009). Similarly, an oral antibiotic treatment given to mice that generally spontaneously develop EAE, due to the transgenic expression of a TCR recognizing a myelin epitope, abolished the development of the CNS disease (Berer et al., 2011). The protection induced by eradicating the gut microbiota has been linked to mechanisms such as: increased number of FoxP3 regulatory T cells, reduced populations of Th1 (IFN γ - producing) and Th17 (IL-17-producing) cells, and impaired ability of dendritic cells to activate Th1 and Th17 responses (Berer et al., 2011; Lee et al., 2011; Ochoa-Reparaz et al., 2009). Moreover, the adoptive transfer of CD25⁺ CD4 T lymphocytes from antibiotic-treated mice to naïve recipients before EAE induction decreased disease severity while CD25⁺CD4 T cells from non-treated donors did not alter EAE susceptibility (Ochoa-Reparaz et al., 2009). The re-colonisation of germ-free mice with segmented filamentous bacteria, that have been shown to promote Th17 cell activation, was sufficient to restore their susceptibility to EAE induction (Lee et al., 2011). In contrast, oral administration of capsular polysaccharide A of *Bacteroides fragilis* or *Pediococcus acidilactici* (strain R037), both known to reduce intestinal inflammation by inducing IL-10-producing CD4 T cells, reduced EAE disease severity (Ochoa-Reparaz et al., 2010; Takata et al., 2011). Overall, these reports indicate that, at least in rodent models, specific gut bacteria or bacterial products can skew T cell responses and thus influence whether or not a detrimental autoimmune response targeting the distant CNS will take place.

Few studies investigated the impact of gut microorganisms on MS pathobiology. Correale and Farez showed that MS patients infected with intestinal parasites, which alter the gut microbiota but also induce a robust Th2 response, had a significantly reduced number of relapses compared to uninfected MS patients (Correale and Farez, 2007; Correale and Farez, 2011). *Clostridium perfringens* type B, usually associated with gastro-intestinal diseases in ruminants, was isolated from a patient with MS at her first clinical presentation (Rumah et al., 2013). Interestingly, these bacteria produce the epsilon toxin, which is neurotoxic in animals (Bokori-Brown et al., 2011). Antibodies targeting this toxin were more prevalent in sera from MS patients than in those from healthy controls (Rumah et al., 2013); whether bacteria of the *Clostridium* genus can modulate immune responses in MS patients is still unknown. It has been recently uncovered that diet patterns such as high salt diet can increase EAE severity (Kleinewietfeld et al., 2013). Moreover, long-term as well as short-term changes in the human

diet have been shown to modify the human gut microbiota (David et al., 2014). As diets shape the gut microbiota, which can influence immune cell responses, we can speculate that some diet patterns favoring specific microbial populations could lead to dampened Th1 and/or Th17 responses while other diets could support the growth of microbial populations promoting such inflammatory responses.

The commensal gut flora has been shown to be essential for the expansion of Mucosal-associated invariant T cells (MAITs) (Treiner et al., 2003). These innate-like cells express an invariant TCR α chain (V α 7.2 J α 33 in humans) and are found in mucosal tissues but also in other organs (e.g. liver) and in peripheral blood (Dusseaux et al., 2011; Gapin, 2014; Le Bourhis et al., 2011; Treiner et al., 2003). Human MAITs express high levels of CD161, CCR6 and cytokine receptors (IL-12, IL-18 and IL-23) and can produce inflammatory cytokines including IFN- γ and IL-17 (Gapin, 2014). Annibali and colleagues observed an elevated proportion of CD161^{hi} CD8 T cells in the peripheral blood of MS patients compared to controls (Annibali et al., 2011). In contrast, other groups detected significantly reduced frequency of CD161^{hi} V α 7.2 expressing T cells (Miyazaki et al., 2011) or CD161^{hi} V α 7.2 CD8 T cells (Willing et al., 2014) in the blood of MS patients compared to healthy controls. Willing and colleagues suggested that such inconsistencies between studies could be due to variation in donors' age as they observed a diminished proportion of MAITs with age in healthy donors (Willing et al., 2014). Notably, the frequency of MAITs was significantly reduced in MS patients following immunosuppressive therapies (Abrahamsson et al., 2013). Moreover, CD8 T cells expressing CD161 and producing IFN γ (Annibali et al., 2011) or expressing the TCRV α 7.2 chain (Abrahamsson et al., 2013; Willing et al., 2014) were detected in post-mortem CNS tissues from MS patients. Whether MAITs contribute to pathological processes observed in MS patients is still unresolved. Finally, whether the impact of the gut microbiota on this specific immune cell subset or other immune cell subsets modulates the development of MS is unknown. Further investigations are deemed essential to determine whether the gut microbiota is indeed a key factor in MS pathogenesis and could be modulated to alter disease (Berer and Krishnamoorthy, 2014; Bhargava and Mowry, 2014).

Crosstalk between T lymphocytes and glial cells

Glial cells, which include astrocytes, oligodendrocytes and microglia, perform highly complex and complementary functions with the ultimate goal of providing support, protection

and optimal conditions for neurons. Microglia are the resident innate immune cells of the CNS and consequently provide the first line of defense against both endogenous and exogenous insults (Giunti et al., 2014). Under normal physiological conditions, resting microglia constantly scrutinize their surroundings, remove cell debris, and sense potential threats via a plethora of receptors such as toll-like receptors and scavenger receptors (Giunti et al., 2014; Goldmann and Prinz, 2013; Strachan-Whaley et al., 2014). A growing body of evidence suggests that the activation of microglia is one of the earliest stages in the development of MS lesions even prior the infiltration of monocytes/macrophages and T lymphocytes (Strachan-Whaley et al., 2014; van Noort et al., 2011). Using a biomarker of activated microglia, investigators performed PET imaging on MS patients as well as on clinically isolated syndrome patients, whom had a first episode of CNS demyelination. They observed increased microglial activation not only in lesions but also in normal appearing white matter in these patients compared to healthy subjects (Giannetti et al., 2015; Politis et al., 2012). Similarly, using multiple techniques (immunohistochemistry, flow cytometry and two-photon microscopy), several groups reported that the activation of microglia precedes the infiltration of macrophages and T cells in EAE models (Davalos et al., 2012; Giunti et al., 2014; Ponomarev et al., 2005). Given their immune properties, such as expression of MHC class I and class II molecules and production of cytokines, as well as their distribution throughout the CNS, microglia are uniquely positioned to influence and modulate the responses of CNS infiltrating immune cells, especially T lymphocytes (Almolda et al., 2011; Strachan-Whaley et al., 2014). In the inflamed CNS, activated microglia and infiltrating macrophages exhibit very similar properties and functions, and are thus often undistinguishable by techniques such as immunohistochemical analysis. Other authors reviewed the numerous protective and beneficial effects of microglia in MS and its animal models (Giunti et al., 2014; Goldmann and Prinz, 2013; Strachan-Whaley et al., 2014). Below, we will briefly discuss the cross-talk between T lymphocytes and microglia/infiltrating macrophages in the context of these demyelinating diseases.

Microglia and macrophages are abundantly present in white matter and cortical demyelinating lesions of MS and EAE; these cells are often detected in close proximity to T lymphocytes (Hucke et al., 2012; Lassmann, 2014; Lucchinetti et al., 2011) supporting the likelihood of active interactions between these cell subsets. An important number of studies

documented that both human and rodent activated microglia are immune competent cells and can efficiently present antigens to both CD4 and CD8 T lymphocytes (Almolda et al., 2011; Aloisi et al., 1999; Carson et al., 1999; Jarry et al., 2013; Strachan-Whaley et al., 2014; Wlodarczyk et al., 2014). Therefore, microglia can contribute to the initial activation of naïve T cells but also the local re-stimulation of infiltrating activated T cells. Activated microglia express elevated levels of MHC class I and class II molecules and several co-stimulatory molecules including CD80, CD86, CD40 and OX40 (Almolda et al., 2010; Giunti et al., 2014; Goldmann and Prinz, 2013; Raivich and Banati, 2004; Strachan-Whaley et al., 2014; Williams et al., 1994; Wlodarczyk et al., 2014). These molecules are engaged in the physical contact between T cells and microglia and can trigger activating signaling pathways in T cells. Moreover, specific subsets of activated microglia have been shown to secrete cytokines that favor either Th1 or Th17 cell subsets (e.g. IL-6, IL-12, IL-23, TNF) (Jack et al., 2005; Strachan-Whaley et al., 2014); although the cytokine levels produced by activated microglia can be lower than those produced by macrophages (Wlodarczyk et al., 2014). In contrast, specific *in vitro* culture conditions of microglia promoted the development of regulatory T lymphocytes expressing FoxP3, which had the capacity to protect from EAE upon adoptive transfer in mice (Ebner et al., 2013). Finally, microglia can acquire the same pro-inflammatory M1 phenotype (producing IL-1, IL-12, TNF) or anti-inflammatory M2 phenotype (producing IL-10 and showing enhanced myelin phagocytosis capacity) that have been originally described for macrophages (Durafour et al., 2012; Nakagawa and Chiba, 2014). Published reports suggest that M2 microglia or macrophages can favor repair and recovery in EAE models (Mikita et al., 2011; Strachan-Whaley et al., 2014). Overall, these results suggest that activated microglia can locally either establish a local inflammatory milieu sustaining the activation of inflammatory T lymphocytes (Giunti et al., 2014; Matyszak et al., 1999), or favor regulatory and anti-inflammatory T lymphocytes (Strachan-Whaley et al., 2014).

The cross-talk between microglia and T cells can also shape microglial properties (Strachan-Whaley et al., 2014). Whereas murine myelin auto-reactive Th1 cells triggered the secretion of proinflammatory molecules such as TNF, IL-1 β and nitrite by microglia, myelin auto-reactive Th2 cells induced the expression of neurotrophic factors such as brain-derived neurotrophic factor and neurotrophin-3 by the same cells (Roy et al., 2007). Moreover, infiltration of IFN γ and IL-17 producing CD4 T cells during EAE concurred with elevated

production of inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-6 and TNF) most likely by microglia. Furthermore, Th1 or Th17 cells caused elevated MHC class I and II expression by microglia in vitro (Murphy et al., 2010). Collectively, these results illustrate that the cross-talk between T lymphocytes and microglia can lead to both detrimental and beneficial effects and contribute to the pathobiology of MS and its animal models. Further studies are deemed essential to understand this intricate T cell-microglia dialogue, especially since several activated T cell subsets (Th1, Th2, Th17, T regs) have the capacity to migrate into the CNS.

An increasing number of publications have underlined the roles of astrocytes in modulating T cell responses especially in the context of MS and its animal models (Mayo et al., 2012). A detailed description of this literature is beyond the scope of the current review. However, we should at least mention that astrocytes can produce cytokines and chemokines, or express molecules that alter T cell responses (Mayo et al., 2012). For example, we have shown that astrocytes in MS lesions expressed elevated levels of PD-L1 and IL-15 and that these mediators can either inhibit or enhance CD8 T cell responses using in vitro assays (Pittet et al., 2011; Saikali et al., 2010). Although, there is no convincing data demonstrating that astrocytes can efficiently present antigen to T cells, these very abundant glial cells can significantly alter CNS inflammation.

Conclusions

In the last decades, the progress achieved by the scientific community to elucidate the complex immune mechanisms involved in the pathobiology of MS is remarkable. Major advances include the identification and characterization of T cell subsets (e.g. Th1, Th17, CD8, regulatory T cells), molecules (e.g. cytokines, chemokines, cell adhesion molecules), and interactions with CNS cells (e.g. BBB-EC, microglia, astrocytes), that contribute to the prototypic inflammatory disease of the CNS and potentially to some extent to other neurological diseases. Moreover, the development of additional rodent models to mirror the intricacies of the multifaceted human disease have provided and will continue to provide invaluable insights to examine the causes underlying disease heterogeneity in patients. This review presented an overview of the impressive body of evidence advocating that both CD4 and CD8 T lymphocytes participate in the development of MS and its animal models. We should highlight that an increasing number of publications have substantiated the contribution

of other immune factors such as B lymphocytes and antibodies to the development of these demyelinating diseases (Krumbholz et al., 2012). In spite of the great number of milestones reached in elucidating MS immunopathobiology, the exact etiology of MS has yet to be defined. Moreover, despite an increasing number of available immunomodulatory or immunosuppressive therapies altering MS progression, there is still no cure available. Therefore, the scientific community should continue hunting for potential immune mechanisms that can be targeted to prevent but also eradicate MS.

Acknowledgements

L.L. is supported by a doctoral studentship from the Multiple Sclerosis Society of Canada.

N.A. holds a New Investigator Salary Award from the Canadian Institutes of Health Research.

Conflict of Interest: The authors declare that they have no conflict of interest.

FIGURE

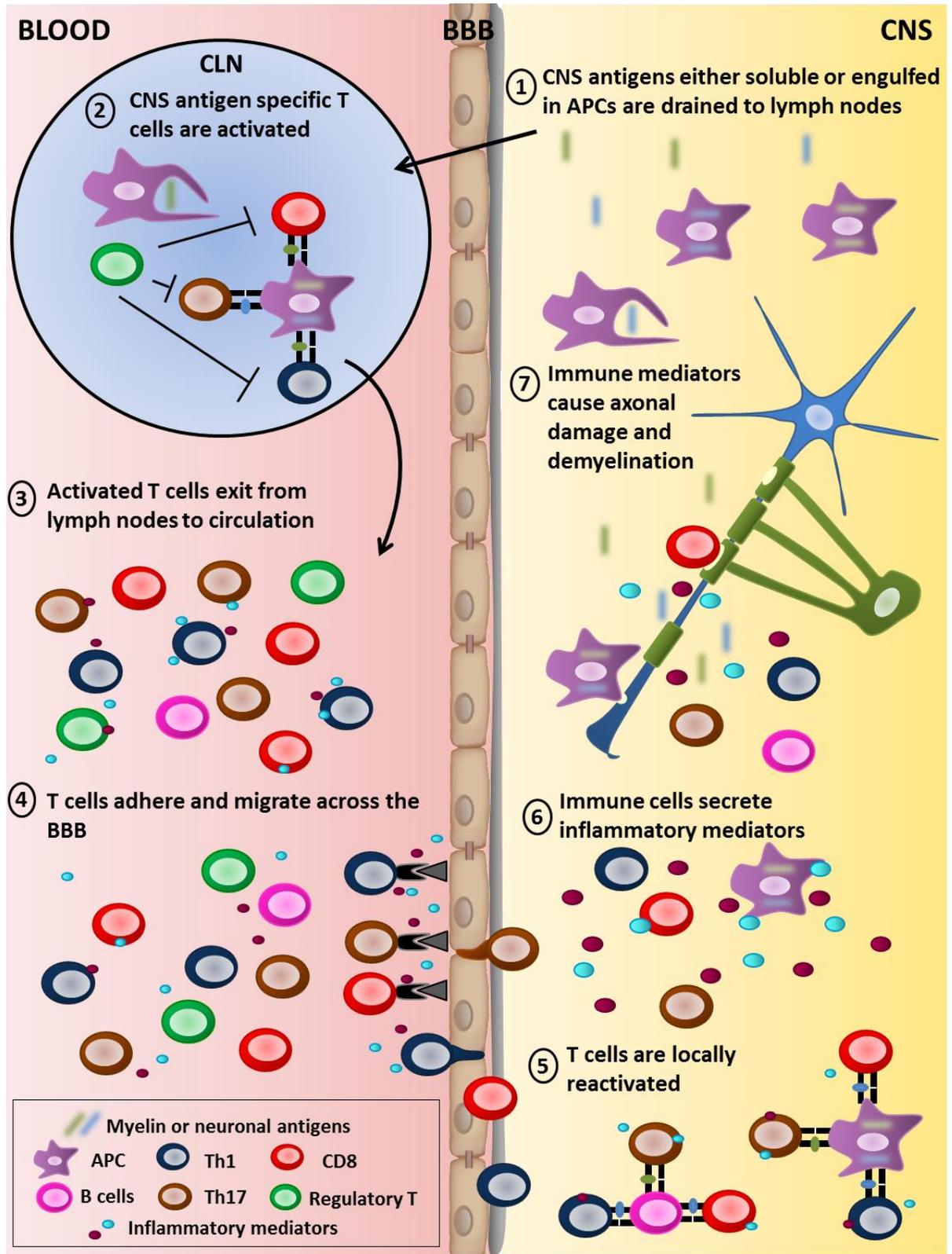


Figure 1: Activation and roles of T lymphocytes in the pathogenesis of MS and EAE

1. In contrast to most organs, the brain and spinal cord do not contain defined lymphatic channels; nevertheless, lymphatic drainage for the CSF and the interstitial fluid of the brain parenchyma to the cervical lymph nodes does take place (Laman and Weller, 2013). Soluble CNS antigens and professional APCs, such as dendritic cells, that have engulfed myelin or neuronal antigens can travel from the CNS to the cervical lymph nodes (Mohammad et al., 2014). 2. Mature APCs that have engulfed myelin or neuronal antigens are detected in cervical lymph nodes obtained from MS patients and EAE animals (Laman and Weller, 2013). These APCs can efficiently activate CNS-reactive CD4 and CD8 T lymphocytes. Different regulatory T lymphocyte subsets have been shown to reduce the development and severity of EAE (Kleinewietfeld and Hafler, 2014; Sinha et al., 2014). Several groups reported that regulatory T cell subsets from MS patients have impaired regulatory functions compared to healthy donors (Kleinewietfeld and Hafler, 2014; Sinha et al., 2014). 3. Activated myelin or neuronal-specific T lymphocytes exit into the peripheral blood to perform immunosurveillance. CNS reactive CD4 and CD8 T lymphocytes obtained from the peripheral blood of MS patients exhibit enhanced activation properties compared to those from healthy donors. 4. Activated autoreactive T lymphocytes have an enhanced capacity to cross the BBB given their elevated expression of mediators such as chemokine receptors, adhesion molecules, integrins, and cytokines (Goverman, 2009; Larochelle et al., 2011). 5. Once in the CNS, T lymphocytes can be reactivated by local APCs (macrophages, microglia and dendritic cells, or B lymphocytes), which are present in human and mouse CNS lesions (Frohman et al., 2006; Greter et al., 2005; Pierson et al., 2014). This antigen-specific reactivation has been shown to be essential to license activated autoreactive T lymphocytes to enter the CNS parenchyma (Bartholomaeus et al., 2009). 6. CNS infiltrating Th1, Th17, and CD8 T lymphocytes, and macrophages as well as inflamed microglia secrete soluble mediators (e.g. inflammatory cytokines, free radical, etc). Moreover, cross-talk between T cells and microglia/macrophages contribute to perpetuate the inflammatory milieu within the CNS. 7. These soluble mediators can injure oligodendrocyte/myelin and axon/neuron structures. Moreover, activated microglia/macrophages can directly phagocyte oligodendrocytes. Similarly, CD8 T lymphocytes have been detected in close proximity to oligodendrocytes and

demyelinated axons with polarization of their cytolytic granules (Lassmann, 2004; Neumann et al., 2002; Saikali et al., 2007; Wulff et al., 2003). Activated T cells have the capacity to kill oligodendrocytes or neurons (Jurewicz et al., 1998; Sauer et al., 2013; Zaguia et al., 2013). Finally, such damage causes the release of additional CNS antigens that can be further phagocytosed and presented to new waves of CNS-specific T lymphocytes.

References

- Abrahamsson SV, Angelini DF, Dubinsky AN, Morel E, Oh U, Jones JL, Carassiti D, Reynolds R, Salvetti M, Calabresi PA, Coles AJ, Battistini L, Martin R, Burt RK, Muraro PA (2013) Non-myeloablative autologous haematopoietic stem cell transplantation expands regulatory cells and depletes IL-17 producing mucosal-associated invariant T cells in multiple sclerosis. *Brain* 136:2888-2903.
- Allegretta M, Nicklas JA, Sriram S, Albertini RJ (1990) T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science* 247:718-721.
- Almolda B, Gonzalez B, Castellano B (2010) Activated microglial cells acquire an immature dendritic cell phenotype and may terminate the immune response in an acute model of EAE. *J Neuroimmunol* 223:39-54.
- Almolda B, Gonzalez B, Castellano B (2011) Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16:1157-1171.
- Aloisi F, Penna G, Polazzi E, Minghetti L, Adorini L (1999) CD40-CD154 interaction and IFN-gamma are required for IL-12 but not prostaglandin E2 secretion by microglia during antigen presentation to Th1 cells. *J Immunol* 162:1384-1391.
- Anderton SM, Kissler S, Lamont AG, Wraith DC (1999) Therapeutic potential of TCR antagonists is determined by their ability to modulate a diverse repertoire of autoreactive T cells. *Eur J Immunol* 29:1850-1857.
- Annibaldi V, Ristori G, Angelini DF, Serafini B, Mechelli R, Cannoni S, Romano S, Paolillo A, Abderrahim H, Diamantini A, Borsellino G, Aloisi F, Battistini L, Salvetti M (2011) CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain* 134:542-554.
- Antel J, Brown M, Nicholas MK, Blain M, Noronha A, Reder A (1988) Activated suppressor cell function in multiple sclerosis--clinical correlations. *J Neuroimmunol* 17:323-330.
- Antel JP, Bania MB, Reder A, Cashman N (1986) Activated suppressor cell dysfunction in progressive multiple sclerosis. *J Immunol* 137:137-141.
- Astier AL, Meiffren G, Freeman S, Hafler DA (2006) Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116:3252-3257.
- Atarashi K, Tanoue T, Shima T, Imaoka A, Kuwahara T, Momose Y, Cheng G, Yamasaki S, Saito T, Ohba Y, Taniguchi T, Takeda K, Hori S, Ivanov, II, Umesaki Y, Itoh K, Honda K (2011) Induction of colonic regulatory T cells by indigenous *Clostridium* species. *Science* 331:337-341.
- Atarashi K et al. (2013) Treg induction by a rationally selected mixture of *Clostridia* strains from the human microbiota. *Nature* 500:232-236.
- Awasthi A, Carrier Y, Peron JP, Bettelli E, Kamanaka M, Flavell RA, Kuchroo VK, Oukka M, Weiner HL (2007) A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 8:1380-1389.
- Axtell RC, Raman C, Steinman L (2013) Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 44:114-120.
- Axtell RC, de Jong BA, Boniface K, van der Voort LF, Bhat R, De Sarno P, Naves R, Han M, Zhong F, Castellanos JG, Mair R, Christakos A, Kolkowitz I, Katz L, Killestein J, Polman CH, de Waal Malefyt R, Steinman L, Raman C (2010) T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 16:406-412.

- Babbe H, Roers A, Waisman A, Lassmann H, Goebels N, Hohlfeld R, Friese M, Schroder R, Deckert M, Schmidt S, Ravid R, 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.
- Baecher-Allan CM, Costantino CM, Cvetanovich GL, Ashley CW, Beriou G, Dominguez-Villar M, Hafler DA (2011) CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4+CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 186:3317-3326.
- Barrat FJ, Cua DJ, Boonstra A, Richards DF, Crain C, Savelkoul HF, de Waal-Malefyt R, Coffman RL, Hawrylowicz CM, O'Garra A (2002) In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195:603-616.
- Bartholomaeus I, Kawakami N, Odoardi F, Schlager C, Miljkovic D, Ellwart JW, Klinkert WE, Flugel-Koch C, Issekutz TB, Wekerle H, Flugel A (2009) Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 462:94-98.
- Baughman EJ, Mendoza JP, Ortega SB, Ayers CL, Greenberg BM, Frohman EM, Karandikar NJ (2011) Neuroantigen-specific CD8+ regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis. *J Autoimmun* 36:115-124.
- Baxter AG (2007) The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7:904-912.
- Behrens F, Tak PP, Ostergaard M, Stoilov R, Wiland P, Huizinga TW, Berenfus VY, Vladeva S, Rech J, Rubbert-Roth A, Korkosz M, Rekalov D, Zupanets IA, Ejbjerg BJ, Geiseler J, Fresenius J, Korolkiewicz RP, Schottelius AJ, Burkhardt H (2014) MOR103, a human monoclonal antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in the treatment of patients with moderate rheumatoid arthritis: results of a phase Ib/IIa randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Ann Rheum Dis* doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204816.
- Berer K, Krishnamoorthy G (2014) Microbial view of central nervous system autoimmunity. *FEBS Lett* 588:4207-4213.
- Berer K, Mues M, Koutrolos M, Rasbi ZA, Boziki M, Johner C, Wekerle H, Krishnamoorthy G (2011) Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479:538-541.
- Berthelot L, Laplaud DA, Pettre S, Ballet C, Michel L, Hillion S, Braudeau C, Connan F, Lefrere F, Wiertlewski S, Guillet JG, Brouard S, Choppin J, Soulillou JP (2008) Blood CD8+ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol* 38:1889-1899.
- Bhargava P, Mowry EM (2014) Gut microbiome and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14:492.
- Bielekova B, Sung MH, Kadom N, Simon R, McFarland H, Martin R (2004) Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 172:3893-3904.
- Bielekova B, Goodwin B, Richert N, Cortese I, Kondo T, Afshar G, Gran B, Eaton J, Antel J, Frank JA, McFarland HF, Martin R (2000) Encephalitogenic potential of the myelin

- basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 6:1167-1175.
- Bin Dhuban K, d'Hennezel E, Nashi E, Bar-Or A, Rieder S, Shevach EM, Nagata S, Piccirillo CA (2015) Coexpression of TIGIT and FCRL3 Identifies Helios+ Human Memory Regulatory T Cells. *J Immunol* 194:3687-3696.
- Bitsch A, Schuchardt J, Bunkowski S, Kuhlmann T, Bruck W (2000) Acute axonal injury in multiple sclerosis. Correlation with demyelination and inflammation. *Brain* 123:1174-1183.
- Bokori-Brown M, Savva CG, Fernandes da Costa SP, Naylor CE, Basak AK, Titball RW (2011) Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J* 278:4589-4601.
- Brynedal B, Duvefelt K, Jonasdottir G, Roos IM, Akesson E, Palmgren J, Hillert J (2007) HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS ONE* 2:e664.
- Calzascia T, Masson F, Di Bernardino-Besson W, Contassot E, Wilmotte R, Aurrand-Lions M, Ruegg C, Dietrich PY, Walker PR (2005) Homing phenotypes of tumor-specific CD8 T cells are predetermined at the tumor site by crosspresenting APCs. *Immunity* 22:175-184.
- Carrieri PB, Provitera V, De Rosa T, Tartaglia G, Gorga F, Perrella O (1998) Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20:373-382.
- Carson MJ, Sutcliffe JG, Campbell IL (1999) Microglia stimulate naive T-cell differentiation without stimulating T-cell proliferation. *J Neurosci Res* 55:127-134.
- Cayrol R, Wosik K, Berard JL, Dodelet-Devillers A, Ifergan I, Kebir H, Haqqani AS, Kreymborg K, Krug S, Moundjian R, Bouthillier A, Becher B, Arbour N, David S, Stanimirovic D, Prat A (2008) Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol* 9:137-145.
- Chastain EM, Miller SD (2012) Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. *Immunol Rev* 245:227-238.
- Chen Y, Langrish CL, McKenzie B, Joyce-Shaikh B, Stumhofer JS, McClanahan T, Blumenschein W, Churakovsa T, Low J, Presta L, Hunter CA, Kastelein RA, Cua DJ (2006) Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 116:1317-1326.
- Cheng W, Chen G (2014) Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. *Mediators Inflamm* 2014:659206.
- Chiarini M, Serana F, Zanotti C, Capra R, Rasia S, Rottoli M, Rovaris M, Caputo D, Cavaletti G, Frigo M, Frigeni B, Clerici R, Rezzonico M, Caimi L, Imberti L (2012) Modulation of the central memory and Tr1-like regulatory T cells in multiple sclerosis patients responsive to interferon-beta therapy. *Mult Scler* 18:788-798.
- Chou YK, Bourdette DN, Offner H, Whitham R, Wang RY, Hashim GA, Vandenbark AA (1992) Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 38:105-113.
- Codarri L, Greter M, Becher B (2013) Communication between pathogenic T cells and myeloid cells in neuroinflammatory disease. *Trends Immunol* 34:114-119.

- Codarri L, Gyulveszi G, Tosevski V, Hesske L, Fontana A, Magnenat L, Suter T, Becher B (2011) ROR γ drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat Immunol* 12:560-567.
- Correale J, Farez M (2007) Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 61:97-108.
- Correale J, Villa A (2008) Isolation and characterization of CD8⁺ regulatory T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 195:121-134.
- Correale J, Farez MF (2011) The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 233:6-11.
- Crawford MP, Yan SX, Ortega SB, Mehta RS, Hewitt RE, Price DA, Stastny P, Douek DC, Koup RA, Racke MK, Karandikar NJ (2004) High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8⁺ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* 103:4222-4231.
- Cross AH, Naismith RT (2014) Established and novel disease-modifying treatments in multiple sclerosis. *J Intern Med* 275:350-363.
- Cua DJ, Sherlock J, Chen Y, Murphy CA, Joyce B, Seymour B, Lucian L, To W, Kwan S, Churakova T, Zurawski S, Wiekowski M, Lira SA, Gorman D, Kastelein RA, Sedgwick JD (2003) Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421:744-748.
- Davalos D, Ryu JK, Merlini M, Baeten KM, Le Moan N, Petersen MA, Deerinck TJ, Smirnov DS, Bedard C, Hakozaki H, Gonias Murray S, Ling JB, Lassmann H, Degen JL, Ellisman MH, Akassoglou K (2012) Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nat Commun* 3:1227.
- David LA, Maurice CF, Carmody RN, Gootenberg DB, Button JE, Wolfe BE, Ling AV, Devlin AS, Varma Y, Fischbach MA, Biddinger SB, Dutton RJ, Turnbaugh PJ (2014) Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505:559-563.
- de Andres C, Aristimuno C, de Las Heras V, Martinez-Gines ML, Bartolome M, Arroyo R, Navarro J, Gimenez-Roldan S, Fernandez-Cruz E, Sanchez-Ramon S (2007) Interferon beta-1a therapy enhances CD4⁺ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 182:204-211.
- de Vos AF, van Meurs M, Brok HP, Boven LA, Hintzen RQ, van der Valk P, Ravid R, Rensing S, Boon L, t Hart BA, Laman JD (2002) Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 169:5415-5423.
- Ding Q, Lu L, Wang B, Zhou Y, Jiang Y, Zhou X, Xin L, Jiao Z, Chou KY (2006) B7H1-Ig fusion protein activates the CD4⁺ IFN- γ receptor⁺ type 1 T regulatory subset through IFN- γ -secreting Th1 cells. *J Immunol* 177:3606-3614.
- Duan H, Xing S, Luo Y, Feng L, Gramaglia I, Zhang Y, Lu D, Zeng Q, Fan K, Feng J, Yang D, Qin Z, Couraud PO, Romero IA, Weksler B, Yan X (2013) Targeting endothelial CD146 attenuates neuroinflammation by limiting lymphocyte extravasation to the CNS. *Sci Rep* 3:1687.

- Durafourt BA, Moore CS, Zammit DA, Johnson TA, Zaguia F, Guiot MC, Bar-Or A, Antel JP (2012) Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia* 60:717-727.
- Dusseaux M, Martin E, Serriari N, Peguillet I, Premel V, Louis D, Milder M, Le Bourhis L, Soudais C, Treiner E, Lantz O (2011) Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* 117:1250-1259.
- Ebner F, Brandt C, Thiele P, Richter D, Schliesser U, Siffrin V, Schueler J, Stubbe T, Ellinghaus A, Meisel C, Sawitzki B, Nitsch R (2013) Microglial activation milieu controls regulatory T cell responses. *J Immunol* 191:5594-5602.
- El-Behi M, Ciric B, Dai H, Yan Y, Cullimore M, Safavi F, Zhang GX, Dittel BN, Rostami A (2011) The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat Immunol* 12:568-575.
- Elhofy A, Depaolo RW, Lira SA, Lukacs NW, Karpus WJ (2009) Mice deficient for CCR6 fail to control chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* 213:91-99.
- Elong Ngono A, Pettre S, Salou M, Bahbouhi B, Soullillou JP, Brouard S, Laplaud DA (2012) Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* 144:117-126.
- Engelhardt B, Ransohoff RM (2012) Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* 33:579-589.
- Ferber IA, Brocke S, Taylor-Edwards C, Ridgway W, Dinisco C, Steinman L, Dalton D, Fathman CG (1996) Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J Immunol* 156:5-7.
- Fitzgerald DC, Zhang GX, El-Behi M, Fonseca-Kelly Z, Li H, Yu S, Saris CJ, Gran B, Ciric B, Rostami A (2007) Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol* 8:1372-1379.
- Fletcher JM, Lalor SJ, Sweeney CM, Tubridy N, Mills KH (2010) T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162:1-11.
- Fogdell-Hahn A, Ligiers A, Gronning M, Hillert J, Olerup O (2000) Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens* 55:140-148.
- Friese MA, Fugger L (2005) Autoreactive CD8+ T cells in multiple sclerosis: a new target for therapy? *Brain* 128:1747-1763.
- Frischer JM, Bramow S, Dal-Bianco A, Lucchinetti CF, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, Sorensen PS, Lassmann H (2009) The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* 132:1175-1189.
- Frohman EM, Racke MK, Raine CS (2006) Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N Engl J Med* 354:942-955.
- Fugger L, Friese MA, Bell JI (2009) From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 9:408-417.
- Fujinami RS, Oldstone MB (1985) Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230:1043-1045.
- Gapin L (2014) Check MAIT. *J Immunol* 192:4475-4480.

- Gartner D, Hoff H, Gimsa U, Burmester GR, Brunner-Weinzierl MC (2006) CD25 regulatory T cells determine secondary but not primary remission in EAE: impact on long-term disease progression. *J Neuroimmunol* 172:73-84.
- Gaur A, Boehme SA, Chalmers D, Crowe PD, Pahuja A, Ling N, Brocke S, Steinman L, Conlon PJ (1997) Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *J Neuroimmunol* 74:149-158.
- Gay FW, Drye TJ, Dick GW, Esiri MM (1997) The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain* 120:1461-1483.
- Geginat J, Paroni M, Maglie S, Alfen JS, Kastirr I, Gruarin P, De Simone M, Pagani M, Abrignani S (2014) Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol* 5:630.
- Genain CP, Zamvil SS (2000) Specific immunotherapy: one size does not fit all. *Nat Med* 6:1098-1100.
- Giannetti P, Politis M, Su P, Turkheimer FE, Malik O, Keihaninejad S, Wu K, Waldman A, Reynolds R, Nicholas R, Piccini P (2015) Increased PK11195-PET binding in normal-appearing white matter in clinically isolated syndrome. *Brain* 138:110-119.
- Giunti D, Parodi B, Cordano C, Uccelli A, Kerlero de Rosbo N (2014) Can we switch microglia's phenotype to foster neuroprotection? Focus on multiple sclerosis. *Immunology* 141:328-339.
- Gobin SJ, Montagne L, Van Zutphen M, Van Der Valk P, Van Den Elsen PJ, De Groot CJ (2001) Upregulation of transcription factors controlling MHC expression in multiple sclerosis lesions. *Glia* 36:68-77.
- Goldmann T, Prinz M (2013) Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clin Dev Immunol* 2013:208093.
- Goverman J (2009) Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* 9:393-407.
- Greter M, Heppner FL, Lemos MP, Odermatt BM, Goebels N, Laufer T, Noelle RJ, Becher B (2005) Dendritic cells permit immune invasion of the CNS in an animal model of multiple sclerosis. *Nat Med* 11:328-334.
- Griffith JW, Sokol CL, Luster AD (2014) Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* 32:659-702.
- Guo B, Chang EY, Cheng G (2008) The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* 118:1680-1690.
- Haak S, Croxford AL, Kreymborg K, Heppner FL, Pouly S, Becher B, Waisman A (2009) IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J Clin Invest* 119:61-69.
- Haas J, Korporal M, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, Wildemann B (2009) Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)CD31(+) T-cells in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 216:113-117.
- Harbo HF et al. (2004) Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue Antigens* 63:237-247.
- Harris MG, Hulseberg P, Ling C, Karman J, Clarkson BD, Harding JS, Zhang M, Sandor A, Christensen K, Nagy A, Sandor M, Fabry Z (2014) Immune privilege of the CNS is not the consequence of limited antigen sampling. *Sci Rep* 4:4422.

- Hauser SL, Bhan AK, Gilles F, Kemp M, Kerr C, Weiner HL (1986) Immunohistochemical analysis of the cellular infiltrate in multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 19:578-587.
- Hemmer B, Fleckenstein BT, Vergelli M, Jung G, McFarland H, Martin R, Wiesmuller KH (1997) Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J Exp Med* 185:1651-1659.
- Hirota K, Duarte JH, Veldhoen M, Hornsby E, Li Y, Cua DJ, Ahlfors H, Wilhelm C, Tolaini M, Menzel U, Garefalaki A, Potocnik AJ, Stockinger B (2011) Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 12:255-263.
- Hoftberger R, Aboul-Enein F, Brueck W, Lucchinetti C, Rodriguez M, Schmidbauer M, Jellinger K, Lassmann H (2004) Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol* 14:43-50.
- Howe CL, Ure D, Adelson JD, LaFrance-Corey R, Johnson A, Rodriguez M (2007) CD8+ T cells directed against a viral peptide contribute to loss of motor function by disrupting axonal transport in a viral model of fulminant demyelination. *J Neuroimmunol* 188:13-21.
- Hu D, Weiner HL, Ritz J (2013) Identification of cytolytic CD161- CD56+ regulatory CD8 T cells in human peripheral blood. *PLoS One* 8:e59545.
- Huber M, Heink S, Pagenstecher A, Reinhard K, Ritter J, Visekruna A, Guralnik A, Bollig N, Jeltsch K, Heinemann C, Wittmann E, Buch T, Prazeres da Costa O, Brustle A, Brenner D, Mak TW, Mittrucker HW, Tackenberg B, Kamradt T, Lohoff M (2013) IL-17A secretion by CD8+ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 123:247-260.
- Hucke S, Flossdorf J, Grutzke B, Dunay IR, Frenzel K, Jungverdorben J, Linnartz B, Mack M, Peitz M, Brustle O, Kurts C, Klockgether T, Neumann H, Prinz M, Wiendl H, Knolle P, Klotz L (2012) Licensing of myeloid cells promotes central nervous system autoimmunity and is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Brain* 135:1586-1605.
- Huizinga R, Hintzen RQ, Assink K, van Meurs M, Amor S (2009) T-cell responses to neurofilament light protein are part of the normal immune repertoire. *Int Immunol* 21:433-441.
- Huseby ES, Liggitt D, Brabb T, Schnabel B, Ohlen C, Goverman J (2001) A pathogenic role for myelin-specific cd8(+) t cells in a model for multiple sclerosis. *J Exp Med* 194:669-676.
- Ifergan I, Kebir H, Alvarez JI, Marceau G, Bernard M, Bourbonniere L, Poirier J, Duquette P, Talbot PJ, Arbour N, Prat A (2011) Central nervous system recruitment of effector memory CD8+ T lymphocytes during neuroinflammation is dependent on alpha4 integrin. *Brain* 134:3560-3577.
- Jack CS, Arbour N, Manusow J, Montgrain V, Blain M, McCrea E, Shapiro A, Antel JP (2005) TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175:4320-4330.
- Jacobsen M, Cepok S, Quak E, Happel M, Gaber R, Ziegler A, Schock S, Oertel WH, Sommer N, Hemmer B (2002) Oligoclonal expansion of memory CD8+ T cells in cerebrospinal fluid from multiple sclerosis patients. *Brain* 125:538-550.

- Jadidi-Niaragh F, Mirshafiey A (2011) Regulatory T-cell as orchestra leader in immunosuppression process of multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33:545-567.
- Jager A, Dardalhon V, Sobel RA, Bettelli E, Kuchroo VK (2009) Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 183:7169-7177.
- Jarry U, Jeannin P, Pineau L, Donnou S, Delneste Y, Couez D (2013) Efficiently stimulated adult microglia cross-prime naive CD8(+) T cells injected in the brain. *Eur J Immunol* 43:1173-1184.
- Ji Q, Perchellet A, Goverman JM (2010) Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol* 11:628-634.
- Ji Q, Castelli L, Goverman JM (2013) MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8(+) T cells. *Nat Immunol* 14:254-261.
- Jiang H, Chess L (2004) An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 114:1198-1208.
- Jiang H, Ware R, Stall A, Flaherty L, Chess L, Pernis B (1995) Murine CD8+ T cells that specifically delete autologous CD4+ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. *Immunity* 2:185-194.
- Jilek S, Schluep M, Rossetti AO, Guignard L, Le Goff G, Pantaleo G, Du Pasquier RA (2007) CSF enrichment of highly differentiated CD8+ T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol* 123:105-113.
- Jones JL, Anderson JM, Phuah CL, Fox EJ, Selmaj K, Margolin D, Lake SL, Palmer J, Thompson SJ, Wilkins A, Webber DJ, Compston DA, Coles AJ (2010) Improvement in disability after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis is associated with neuroprotective autoimmunity. *Brain* 133:2232-2247.
- Junker A, Ivanidze J, Malotka J, Eiglmeier I, Lassmann H, Wekerle H, Meinl E, Hohlfeld R, Dornmair K (2007) Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* 130:2789-2799.
- Jurewicz A, Biddison WE, Antel JP (1998) MHC class I-restricted lysis of human oligodendrocytes by myelin basic protein peptide-specific CD8 T lymphocytes. *J Immunol* 160:3056-3059.
- Kabat EA, Wolf A, Bezer AE, Murray JP (1951) Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J Exp Med* 93:615-633.
- Kawamoto S, Maruya M, Kato LM, Suda W, Atarashi K, Doi Y, Tsutsui Y, Qin H, Honda K, Okada T, Hattori M, Fagarasan S (2014) Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* 41:152-165.
- Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, Bernard M, Poirier J, Arbour N, Duquette P, Prat A (2009) Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 66:390-402.
- Kebir H, Kreymborg K, Ifergan I, Dodelet-Devillers A, Cayrol R, Bernard M, Giuliani F, Arbour N, Becher B, Prat A (2007) Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* 13:1173-1175.

- Kivisakk P, Mahad DJ, Callahan MK, Sikora K, Trebst C, Tucky B, Wujek J, Ravid R, Staugaitis SM, Lassmann H, Ransohoff RM (2004) Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Ann Neurol* 55:627-638.
- Kleinewietfeld M, Hafler DA (2014) Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol Rev* 259:231-244.
- Kleinewietfeld M, Manzel A, Titze J, Kvakana H, Yosef N, Linker RA, Muller DN, Hafler DA (2013) Sodium chloride drives autoimmune disease by the induction of pathogenic TH17 cells. *Nature* 496:518-522.
- Koch MW, Metz LM, Agrawal SM, Yong VW (2013) Environmental factors and their regulation of immunity in multiple sclerosis. *J Neurol Sci* 324:10-16.
- Kohm AP, Carpentier PA, Anger HA, Miller SD (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* 169:4712-4716.
- Kooi EJ, van Horssen J, Witte ME, Amor S, Bo L, Dijkstra CD, van der Valk P, Geurts JJ (2009) Abundant extracellular myelin in the meninges of patients with multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* 35:283-295.
- Korporal M, Haas J, Balint B, Fritzsching B, Schwarz A, Moeller S, Fritz B, Suri-Payer E, Wildemann B (2008) Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Arch Neurol* 65:1434-1439.
- Kreymborg K, Etzensperger R, Dumoutier L, Haak S, Rebollo A, Buch T, Heppner FL, Renaud JC, Becher B (2007) IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 179:8098-8104.
- Krishnamoorthy G, Saxena A, Mars LT, Domingues HS, Mentele R, Ben-Nun A, Lassmann H, Dornmair K, Kurschus FC, Liblau RS, Wekerle H (2009) Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nat Med* 15:626-632.
- Kroenke MA, Carlson TJ, Andjelkovic AV, Segal BM (2008) IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med* 205:1535-1541.
- Krumbholz M, Derfuss T, Hohlfeld R, Meinl E (2012) B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol* 8:613-623.
- Kuhlmann T, Lingfeld G, Bitsch A, Schuchardt J, Bruck W (2002) Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125:2202-2212.
- Kumar N, Narang K, Cressey BD, Gottlieb AB (2013) Long-term safety of ustekinumab for psoriasis. *Expert Opin Drug Saf* 12:757-765.
- Laman JD, Weller RO (2013) Drainage of cells and soluble antigen from the CNS to regional lymph nodes. *J Neuroimmune Pharmacol* 8:840-856.
- Langrish CL, Chen Y, Blumenschein WM, Mattson J, Basham B, Sedgwick JD, McClanahan T, Kastelein RA, Cua DJ (2005) IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation. *J Exp Med* 201:233-240.
- Larochelle C, Alvarez JI, Prat A (2011) How do immune cells overcome the blood-brain barrier in multiple sclerosis? *FEBS Lett* 585:3770-3780.

- Larochelle C, Lecuyer MA, Alvarez JI, Charabati M, Saint-Laurent O, Ghannam S, Kebir H, Flanagan K, Yednock T, Duquette P, Arbour N, Prat A (2015) MCAM CD8 T lymphocytes mediate CNS inflammation. *Ann Neurol* doi: 10.1002/ana.24415.
- Larochelle C, Cayrol R, Kebir H, Alvarez JI, Lecuyer MA, Ifergan I, Viel E, Bourbonniere L, Beauseigle D, Terouz S, Hachehouche L, Gendron S, Poirier J, Jobin C, Duquette P, Flanagan K, Yednock T, Arbour N, Prat A (2012) Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain* 135:2906-2924.
- Lassmann H (2004) Recent neuropathological findings in MS--implications for diagnosis and therapy. *J Neurol* 251 Suppl 4:IV2-5.
- Lassmann H (2014) Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis. *Glia* 62:1816-1830.
- Le Bourhis L, Guerri L, Dusseaux M, Martin E, Soudais C, Lantz O (2011) Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. *Trends Immunol* 32:212-218.
- Lee YH, Ishida Y, Rifa'i M, Shi Z, Isobe K, Suzuki H (2008) Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180:825-832.
- Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK (2011) Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1:4615-4622.
- Li Y, Chu N, Hu A, Gran B, Rostami A, Zhang GX (2007) Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain* 130:490-501.
- Liblau R, Tournier-Lasserre E, Maciazek J, Dumas G, Siffert O, Hashim G, Bach MA (1991) T cell response to myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis patients and healthy subjects. *Eur J Immunol* 21:1391-1395.
- Lindsey JW, Hodgkinson S, Mehta R, Mitchell D, Enzmann D, Steinman L (1994) Repeated treatment with chimeric anti-CD4 antibody in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36:183-189.
- Link H (1998) The cytokine storm in multiple sclerosis. *Mult Scler* 4:12-15.
- Liu W, Putnam AL, Xu-Yu Z, Szot GL, Lee MR, Zhu S, Gottlieb PA, Kapranov P, Gingeras TR, Fazekas de St Groth B, Clayberger C, Soper DM, Ziegler SF, Bluestone JA (2006) CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4+ T reg cells. *J Exp Med* 203:1701-1711.
- Llewellyn-Smith N, Lai M, Miller DH, Rudge P, Thompson AJ, Cuzner ML (1997) Effects of anti-CD4 antibody treatment on lymphocyte subsets and stimulated tumor necrosis factor alpha production: a study of 29 multiple sclerosis patients entered into a clinical trial of cM-T412. *Neurology* 48:810-816.
- Lovett-Racke AE, Yang Y, Racke MK (2011) Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim Biophys Acta* 1812:246-251.
- Lowther DE, Hafler DA (2012) Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev* 248:156-169.
- Lu L, Kim HJ, Werneck MB, Cantor H (2008) Regulation of CD8+ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105:19420-19425.

- Lublin FD, Knobler RL, Kalman B, Goldhaber M, Marini J, Perrault M, D'Imperio C, Joseph J, Alkan SS, Korngold R (1993) Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis. *Autoimmunity* 16:267-274.
- Lucca LE, Desbois S, Ramadan A, Ben-Nun A, Eisenstein M, Carrie N, Guery JC, Sette A, Nguyen P, Geiger TL, Mars LT, Liblau RS (2014) Bispecificity for myelin and neuronal self-antigens is a common feature of CD4 T cells in C57BL/6 mice. *J Immunol* 193:3267-3277.
- Lucchinetti CF, Popescu BF, Bunyan RF, Moll NM, Roemer SF, Lassmann H, Bruck W, Parisi JE, Scheithauer BW, Giannini C, Weigand SD, Mandrekar J, Ransohoff RM (2011) Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365:2188-2197.
- Lutterotti A, Martin R (2014) Antigen-specific tolerization approaches in multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* 23:9-20.
- Major EO (2010) Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med* 61:35-47.
- Mars LT, Saikali P, Liblau RS, Arbour N (2011) Contribution of CD8 T lymphocytes to the immuno-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. *Biochim Biophys Acta* 1812:151-161.
- Martinez-Forero I, Garcia-Munoz R, Martinez-Pasamar S, Inoges S, Lopez-Diaz de Cerio A, Palacios R, Sepulcre J, Moreno B, Gonzalez Z, Fernandez-Diez B, Melero I, Bendandi M, Villoslada P (2008) IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 38:576-586.
- Masson F, Calzascia T, Di Bernardino-Besson W, de Tribolet N, Dietrich PY, Walker PR (2007) Brain microenvironment promotes the final functional maturation of tumor-specific effector CD8+ T cells. *J Immunol* 179:845-853.
- Matyszak MK, Denis-Donini S, Citterio S, Longhi R, Granucci F, Ricciardi-Castagnoli P (1999) Microglia induce myelin basic protein-specific T cell anergy or T cell activation, according to their state of activation. *Eur J Immunol* 29:3063-3076.
- Mayo L, Quintana FJ, Weiner HL (2012) The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev* 248:170-187.
- McGeachy MJ, Stephens LA, Anderton SM (2005) Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175:3025-3032.
- McMahon EJ, Bailey SL, Castenada CV, Waldner H, Miller SD (2005) Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nat Med* 11:335-339.
- McQualter JL, Darwiche R, Ewing C, Onuki M, Kay TW, Hamilton JA, Reid HH, Bernard CC (2001) Granulocyte macrophage colony-stimulating factor: a new putative therapeutic target in multiple sclerosis. *J Exp Med* 194:873-882.
- McRae BL, Vanderlugt CL, Dal Canto MC, Miller SD (1995) Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 182:75-85.
- Mellergard J, Edstrom M, Vrethem M, Ernerudh J, Dahle C (2010) Natalizumab treatment in multiple sclerosis: marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 16:208-217.
- Michel L, Berthelot L, Pettre S, Wiertlewski S, Lefrere F, Braudeau C, Brouard S, Soulillou JP, Laplaud DA (2008) Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have

- normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest* 118:3411-3419.
- Mikita J, Dubourdiou-Cassagno N, Deloire MS, Vekris A, Biran M, Raffard G, Brochet B, Canron MH, Franconi JM, Boiziau C, Petry KG (2011) Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Mult Scler* 17:2-15.
- Mittrucker HW, Visekruna A, Huber M (2014) Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 62:449-458.
- Miyazaki Y, Miyake S, Chiba A, Lantz O, Yamamura T (2011) Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol* 23:529-535.
- Mohammad MG, Tsai VW, Ruitenber MJ, Hassanpour M, Li H, Hart PH, Breit SN, Sawchenko PE, Brown DA (2014) Immune cell trafficking from the brain maintains CNS immune tolerance. *J Clin Invest* 124:1228-1241.
- Monteyne P, Van Antwerpen MP, Sindic CJ (1999) Expression of costimulatory molecules and cytokines in CSF and peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Belg* 99:11-20.
- Moreno M, Bannerman P, Ma J, Guo F, Miers L, Soulika AM, Pleasure D (2014) Conditional ablation of astroglial CCL2 suppresses CNS accumulation of M1 macrophages and preserves axons in mice with MOG peptide EAE. *J Neurosci* 34:8175-8185.
- Multiple Sclerosis International Federation (2013) Atlas of MS 2013. In, http://www.msif.org/includes/documents/cm_docs/2013/m/msif-atlas-of-ms-2013-report.pdf?f=1 Edition (Federation MSI, ed). http://www.msif.org/includes/documents/cm_docs/2013/m/msif-atlas-of-ms-2013-report.pdf?f=1.
- Murphy AC, Lalor SJ, Lynch MA, Mills KH (2010) Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* 24:641-651.
- Murray PD, Pavelko KD, Leibowitz J, Lin X, Rodriguez M (1998) CD4(+) and CD8(+) T cells make discrete contributions to demyelination and neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis. *J Virol* 72:7320-7329.
- Najafian N, Chitnis T, Salama AD, Zhu B, Benou C, Yuan X, Clarkson MR, Sayegh MH, Khoury SJ (2003) Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model. *J Clin Invest* 112:1037-1048.
- Nakagawa Y, Chiba K (2014) Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals* 7:1028-1048.
- Neumann H, Medana IM, Bauer J, Lassmann H (2002) Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci* 25:313-319.
- Nicholson LB, Greer JM, Sobel RA, Lees MB, Kuchroo VK (1995) An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 3:397-405.
- Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Ditrio LE, Burroughs AR, Foureau DM, Haque-Begum S, Kasper LH (2009) Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 183:6041-6050.

- Ochoa-Reparaz J, Mielcarz DW, Wang Y, Begum-Haque S, Dasgupta S, Kasper DL, Kasper LH (2010) A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol* 3:487-495.
- Olivares-Villagomez D, Wang Y, Lafaille JJ (1998) Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 188:1883-1894.
- Olson JK, Croxford JL, Calenoff MA, Dal Canto MC, Miller SD (2001) A virus-induced molecular mimicry model of multiple sclerosis. *J Clin Invest* 108:311-318.
- Ota K, Matsui M, Milford EL, Mackin GA, Weiner HL, Hafler DA (1990) T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346:183-187.
- Panitch HS, Hirsch RL, Haley AS, Johnson KP (1987a) Exacerbations of multiple sclerosis in patients treated with gamma interferon. *Lancet* 1:893-895.
- Panitch HS, Hirsch RL, Schindler J, Johnson KP (1987b) Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37:1097-1102.
- Pierson E, Simmons SB, Castelli L, Goverman JM (2012) Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. *Immunol Rev* 248:205-215.
- Pierson ER, Stromnes IM, Goverman JM (2014) B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the central nervous system. *J Immunol* 192:929-939.
- Pittet CL, Newcombe J, Antel JP, Arbour N (2011) The majority of infiltrating CD8 T lymphocytes in multiple sclerosis lesions is insensitive to enhanced PD-L1 levels on CNS cells. *Glia* 59:841-856.
- Politis M, Giannetti P, Su P, Turkheimer F, Keihaninejad S, Wu K, Waldman A, Malik O, Matthews PM, Reynolds R, Nicholas R, Piccini P (2012) Increased PK11195 PET binding in the cortex of patients with MS correlates with disability. *Neurology* 79:523-530.
- Polman CH, O'Connor PW, Havrdova E, Hutchinson M, Kappos L, Miller DH, Phillips JT, Lublin FD, Giovannoni G, Wajgt A, Toal M, Lynn F, Panzara MA, Sandrock AW, Investigators A (2006) A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354:899-910.
- Ponomarev ED, Shriver LP, Maresz K, Dittel BN (2005) Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *J Neurosci Res* 81:374-389.
- Raivich G, 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* 46:261-281.
- Ransohoff RM, Estes ML (1991) Astrocyte expression of major histocompatibility complex gene products in multiple sclerosis brain tissue obtained by stereotactic biopsy. *Arch Neurol* 48:1244-1246.
- Raphael I, Nalawade S, Eagar TN, Forsthuber TG (2014) T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine pii: S1043-4666(14)00539-0*.
- Reboldi A, Coisne C, Baumjohann D, Benvenuto F, Bottinelli D, Lira S, Uccelli A, Lanzavecchia A, Engelhardt B, Sallusto F (2009) C-C chemokine receptor 6-

- regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 10:514-523.
- Reddy J, Illes Z, Zhang X, Encinas J, Pyrdol J, Nicholson L, Sobel RA, Wucherpfennig KW, Kuchroo VK (2004) Myelin proteolipid protein-specific CD4⁺CD25⁺ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:15434-15439.
- Rep MH, van Oosten BW, Roos MT, Ader HJ, Polman CH, van Lier RA (1997) Treatment with depleting CD4 monoclonal antibody results in a preferential loss of circulating naive T cells but does not affect IFN-gamma secreting TH1 cells in humans. *J Clin Invest* 99:2225-2231.
- Rivers TM, Sprunt DH, Berry GP (1933) Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med* 58:39-53.
- Roy A, Liu X, Pahan K (2007) Myelin basic protein-primed T cells induce neurotrophins in glial cells via alpha_vbeta₃ [corrected] integrin. *J Biol Chem* 282:32222-32232.
- Rubio JP, Bahlo M, Stankovich J, Burfoot RK, Johnson LJ, Huxtable S, Butzkueven H, Lin L, Taylor BV, Speed TP, Kilpatrick TJ, Mignot E, Foote SJ (2007) Analysis of extended HLA haplotypes in multiple sclerosis and narcolepsy families confirms a predisposing effect for the class I region in Tasmanian MS patients. *Immunogenetics* 59:177-186.
- Rumah KR, Linden J, Fischetti VA, Vartanian T (2013) Isolation of *Clostridium perfringens* type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. *PloS one* 8:e76359.
- Saikali P, Antel JP, Pittet CL, Newcombe J, Arbour N (2010) Contribution of astrocyte-derived IL-15 to CD8 T cell effector functions in multiple sclerosis. *J Immunol* 185:5693-5703.
- Saikali P, Antel JP, Newcombe J, Chen Z, Freedman M, Blain M, Cayrol R, Prat A, Hall JA, Arbour N (2007) NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurosci* 27:1220-1228.
- Sallusto F, Geginat J, Lanzavecchia A (2004) Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22:745-763.
- Sauer BM, Schmalstieg WF, Howe CL (2013) Axons are injured by antigen-specific CD8(+) T cells through a MHC class I- and granzyme B-dependent mechanism. *Neurobiol Dis* 59:194-205.
- Sawcer S, Franklin RJ, Ban M (2014) Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol* 13:700-709.
- Schneider-Hohendorf T, Stenner MP, Weidenfeller C, Zozulya AL, Simon OJ, Schwab N, Wiendl H (2010) Regulatory T cells exhibit enhanced migratory characteristics, a feature impaired in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 40:3581-3590.
- Schneider-Hohendorf T, Rossaint J, Mohan H, Boning D, Breuer J, Kuhlmann T, Gross CC, Flanagan K, Sorokin L, Vestweber D, Zarbock A, Schwab N, Wiendl H (2014) VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. *J Exp Med* 211:1833-1846.
- Seddiki N, Santner-Nanan B, Martinson J, Zaunders J, Sasson S, Landay A, Solomon M, Selby W, Alexander SI, Nanan R, Kelleher A, Fazekas de St Groth B (2006) Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203:1693-1700.

- Segal BM, Constantinescu CS, Raychaudhuri A, Kim L, Fidelus-Gort R, Kasper LH, Ustekinumab MSI (2008) Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol* 7:796-804.
- Sharief MK, Thompson EJ (1993) Correlation of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor with clinical activity of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56:169-174.
- Shevach EM, Thornton AM (2014) tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev* 259:88-102.
- Shinohara ML, Kim JH, Garcia VA, Cantor H (2008) Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity* 29:68-78.
- Sinha S, Itani FR, Karandikar NJ (2014) Immune regulation of multiple sclerosis by CD8⁺ T cells. *Immunol Res* 59:254-265.
- Skulina C, Schmidt S, Dornmair K, Babbe H, Roers A, Rajewsky K, Wekerle H, Hohlfeld R, Goebels N (2004) Multiple sclerosis: brain-infiltrating CD8⁺ T cells persist as clonal expansions in the cerebrospinal fluid and blood. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101:2428-2433.
- Sonderregger I, Kisielow J, Meier R, King C, Kopf M (2008) IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *Eur J Immunol* 38:1833-1838.
- Stoolman JS, Duncker PC, Huber AK, Segal BM (2014) Site-specific chemokine expression regulates central nervous system inflammation and determines clinical phenotype in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 193:564-570.
- Strachan-Whaley M, Rivest S, Yong VW (2014) Interactions between microglia and T cells in multiple sclerosis pathobiology. *J Interferon Cytokine Res* 34:615-622.
- Stromnes IM, Goverman JM (2006a) Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1:1952-1960.
- Stromnes IM, Goverman JM (2006b) Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc* 1:1810-1819.
- Stromnes IM, Cerretti LM, Liggitt D, Harris RA, Goverman JM (2008) Differential regulation of central nervous system autoimmunity by T(H)1 and T(H)17 cells. *Nat Med* 14:337-342.
- Strunk T, Bubel S, Mascher B, Schlenke P, Kirchner H, Wandinger KP (2000) Increased numbers of CCR5⁺ interferon-gamma- and tumor necrosis factor-alpha-secreting T lymphocytes in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 47:269-273.
- Stumhofer JS, Silver JS, Laurence A, Porrett PM, Harris TH, Turka LA, Ernst M, Saris CJ, O'Shea JJ, Hunter CA (2007) Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 8:1363-1371.
- Sun D, Whitaker JN, Huang Z, Liu D, Coleclough C, Wekerle H, Raine CS (2001) Myelin antigen-specific CD8⁺ T cells are encephalitogenic and produce severe disease in C57BL/6 mice. *J Immunol* 166:7579-7587.
- Sun JB, Olsson T, Wang WZ, Xiao BG, Kostulas V, Fredrikson S, Ekre HP, Link H (1991) Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls. *Eur J Immunol* 21:1461-1468.

- Sweeney CM, Lonergan R, Basdeo SA, Kinsella K, Dungan LS, Higgins SC, Kelly PJ, Costelloe L, Tubridy N, Mills KH, Fletcher JM (2011) IL-27 mediates the response to IFN-beta therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain Behav Immun* 25:1170-1181.
- Takata K, Kinoshita M, Okuno T, Moriya M, Kohda T, Honorat JA, Sugimoto T, Kumanogoh A, Kayama H, Takeda K, Sakoda S, Nakatsuji Y (2011) The lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing IL-10-producing regulatory T cells. *PloS one* 6:e27644.
- Talbot PJ, Paquette JS, Ciurli C, Antel JP, Ouellet F (1996) Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 39:233-240.
- Tennakoon DK, Mehta RS, Ortega SB, Bhoj V, Racke MK, Karandikar NJ (2006) Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 176:7119-7129.
- Treiner E, Duban L, Bahram S, Radosavljevic M, Wanner V, Tilloy F, Affaticati P, Gilfillan S, Lantz O (2003) Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 422:164-169.
- Tzartos JS, Friese MA, Craner MJ, Palace J, Newcombe J, Esiri MM, Fugger L (2008) Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172:146-155.
- van Noort JM, van den Elsen PJ, van Horssen J, Geurts JJ, van der Valk P, Amor S (2011) Preactive multiple sclerosis lesions offer novel clues for neuroprotective therapeutic strategies. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10:68-81.
- van Oosten BW, Lai M, Hodgkinson S, Barkhof F, Miller DH, Moseley IF, Thompson AJ, Rudge P, McDougall A, McLeod JG, Ader HJ, Polman CH (1997) Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology* 49:351-357.
- van Zwam M, Huizinga R, Heijmans N, van Meurs M, Wierenga-Wolf AF, Melief MJ, Hintzen RQ, t Hart BA, Amor S, Boven LA, Laman JD (2009a) Surgical excision of CNS-draining lymph nodes reduces relapse severity in chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pathol* 217:543-551.
- van Zwam M, Huizinga R, Melief MJ, Wierenga-Wolf AF, van Meurs M, Voerman JS, Biber KP, Boddeke HW, Hopken UE, Meisel C, Meisel A, Bechmann I, Hintzen RQ, t Hart BA, Amor S, Laman JD, Boven LA (2009b) Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE. *J Mol Med (Berl)* 87:273-286.
- Vanderlugt CL, Neville KL, Nikcevich KM, Eagar TN, Bluestone JA, Miller SD (2000) Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoepitopes in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 164:670-678.
- Vandevyver C, Mertens N, van den Elsen P, Medaer R, Raus J, Zhang J (1995) Clonal expansion of myelin basic protein-reactive T cells in patients with multiple sclerosis: restricted T cell receptor V gene rearrangements and CDR3 sequence. *Eur J Immunol* 25:958-968.
- Vasanthakumar A, Kallies A (2013) IL-27 paves different roads to Tr1. *Eur J Immunol* 43:882-885.

- Venken K, Hellings N, Broekmans T, Hensen K, Rummens JL, Stinissen P (2008) Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol* 180:6411-6420.
- Viglietta V, Baecher-Allan C, Weiner HL, Hafler DA (2004) Loss of functional suppression by CD4+CD25+ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199:971-979.
- Villares R, Cadenas V, Lozano M, Almonacid L, Zaballos A, Martinez AC, Varona R (2009) CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4+ T-cell recruitment to target tissues. *Eur J Immunol* 39:1671-1681.
- Vollmer TL, Wynn DR, Alam MS, Valdes J (2011) A phase 2, 24-week, randomized, placebo-controlled, double-blind study examining the efficacy and safety of an anti-interleukin-12 and -23 monoclonal antibody in patients with relapsing-remitting or secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 17:181-191.
- Walker LS, Abbas AK (2002) The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2:11-19.
- Willenborg DO, Fordham S, Bernard CC, Cowden WB, Ramshaw IA (1996) IFN-gamma plays a critical down-regulatory role in the induction and effector phase of myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 157:3223-3227.
- Williams K, Ulvestad E, Antel JP (1994) B7/BB-1 antigen expression on adult human microglia studied in vitro and in situ. *Eur J Immunol* 24:3031-3037.
- Willing A, Friese MA (2012) CD8-mediated inflammatory central nervous system disorders. *Curr Opin Neurol* 25:316-321.
- Willing A, Leach OA, Ufer F, Attfield KE, Steinbach K, Kursawe N, Piedavent M, Friese MA (2014) CD8(+) MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate with IL-18 serum levels in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 44:3119-3128.
- Wlodarczyk A, Lobner M, Cedile O, Owens T (2014) Comparison of microglia and infiltrating CD11c(+) cells as antigen presenting cells for T cell proliferation and cytokine response. *J Neuroinflammation* 11:57.
- Wong D, Dorovini-Zis K (1992) Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* 39:11-21.
- Wong D, Dorovini-Zis K (1995) Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *Microvasc Res* 49:325-339.
- Wu GF, Alvarez E (2011) The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 29:257-278.
- Wu GF, Dandekar AA, Pewe L, Perlman S (2000) CD4 and CD8 T cells have redundant but not identical roles in virus-induced demyelination. *J Immunol* 165:2278-2286.
- Wucherpfennig KW, Strominger JL (1995) Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80:695-705.

- Wulff H, Calabresi PA, Allie R, Yun S, Pennington M, Beeton C, Chandy KG (2003) The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest* 111:1703-1713.
- Yu M, Johnson JM, Tuohy VK (1996) A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med* 183:1777-1788.
- Yu P, Bamford RN, Waldmann TA (2014) IL-15-dependent CD8⁺ CD122⁺ T cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating IL-17 production by CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* 44:3330-3341.
- Zaguia F, Saikali P, Ludwin S, Newcombe J, Beauseigle D, McCrea E, Duquette P, Prat A, Antel JP, Arbour N (2013) Cytotoxic NKG2C⁺ CD4 T cells target oligodendrocytes in multiple sclerosis. *J Immunol* 190:2510-2518.
- Zang YC, Li S, Rivera VM, Hong J, Robinson RR, Breitbach WT, Killian J, Zhang JZ (2004) Increased CD8⁺ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol* 172:5120-5127.
- Zhang J, Markovic-Plese S, Lacet B, Raus J, Weiner HL, Hafler DA (1994) Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 179:973-984.

Nous avons abordé dans ce chapitre les caractéristiques des principales cellules composant le SNC c'est à dire les neurones, les astrocytes, les oligodendrocytes et les microglies. Ensuite nous nous sommes penchés sur le SI et notamment sur le SI adaptatif composé des lymphocytes avant de nous intéresser au récepteur NKG2D et à ses ligands. Nous avons vu qu'une dérégulation de la voie de signalisation NKG2D-NKG2DL pouvait participer au développement de maladies inflammatoires. La dernière partie de cette introduction traite de la maladie inflammatoire du SNC qu'est la SEP et de l'implication des LT dans sa pathogénèse. Ce cadre établi me permet d'aborder les hypothèses et objectifs de mon doctorat sur le rôle de NKG2D exprimé par les LT CD8 et de ses ligands dans la SEP.

5.0 Hypothèses et objectifs

Malgré les avancées de la recherche sur la SEP, l'étiologie de cette maladie est toujours inconnue et aucun traitement curatif n'existe. Ces dernières années de belles avancées des connaissances ont permis la mise sur le marché de nouveaux médicaments permettant de limiter la progression de cette maladie. Malgré l'efficacité de ces thérapies il serait important d'avoir des traitements plus ciblés et curatifs. Avec environ 100 000 personnes atteintes, le Canada a un des plus hauts taux de patients touchés par la SEP. Il est donc primordial de continuer les efforts en recherche et à terme de soigner cette maladie. Mon projet de doctorat vise à étudier l'implication d'un sous type de cellule immunitaire caractérisé par l'expression d'NKG2D dans la SEP et d'établir si ce récepteur ou ces ligands pourrait être une bonne cible thérapeutique.

Je me suis intéressée à l'interaction NKG2D-NKG2DL par rapport à des données acquises chez l'humain dans le laboratoire avant mon arrivée. En effet, ils ont mis en évidence que les oligodendrocytes dans les lésions de SEP expriment les ligands de NKG2D MICA/MICB, que des LT CD8 sont retrouvés à proximité de ces cellules et qu'in vitro empêcher l'interaction entre le NKG2D et ses ligands inhibe la mort des oligodendrocytes engendrée par les cellules immunitaires activées (Saikali et al., 2007). En outre, des études récentes chez la souris sont venues étayer ces résultats en montrant que la sévérité de l'EAE est moindre chez les souris déficientes pour NKG2D si une concentration sous optimale de MOG est utilisée, que bloquer le NKG2D diminue l'infiltration des LT et la sévérité de l'EAE et que

durant l'EAE une augmentation de l'ARNm de certains isoformes de RAE-1 est détectée dans les macrophages et les microglies (Djelloul et al., 2016; Guerra et al., 2013; Ruck et al., 2013).

Notre hypothèse de travail était que l'interaction entre NKG2D et ses ligands contribue au développement de la SEP et mon objectif a été d'approfondir le rôle du NKG2D et de ses ligands en utilisant un modèle murin de la SEP, l'EAE. Mes buts étaient :

1. De caractériser l'expression des NKG2DL au niveau de l'ARNm et des protéines aux différents stades de la maladie. Comme détaillé dans le paragraphe 3.2, NKG2D a de multiples ligands ayant des régulations diverses et une expression caractéristique suivant les stimuli/pathologies. Je souhaitais déterminer si l'EAE est associée à un profil d'expression des ligands qui lui est spécifique.
2. D'établir l'impact des NKG2DL sur les cellules immunitaires *in vitro*. Comme mentionné dans le paragraphe 3.3 le rôle des ligands peut être différent dans une même pathologie (RAE-1 vs MULT1).
3. D'établir la contribution du NKG2D au développement de la maladie par transfert de splénocytes dans des souris C57BL/6 sauvages ou déficientes pour le NKG2D. Les populations de cellules NK, NKT et $\gamma\delta$ T dans l'EAE étant très faible, un faible pourcentage de LT CD4 exprimant NKG2D et les données du laboratoire mettant en évidence une implication des LT CD8 exprimant NKG2D dans la SEP, je me suis particulièrement intéressée à cette dernière population de cellules immunitaires au cours de ma thèse.

Un sous projet s'est dessiné dans le cadre de mon but 1. Mon hypothèse était que les ligands du NKG2D étaient exprimés par les cellules neurales du SNC et que l'interaction NKG2D-NKG2DL entraînait la mort de ces cellules. La cytométrie de flux étant une méthode particulièrement intéressante pour quantifier et caractériser les cellules immunitaires infiltrant le SNC dans l'EAE, mon objectif a été de développer une technique de cytométrie de flux permettant de détecter à la fois les cellules immunitaires et neurales. Mon but était d'optimiser les procédures appliquées aux tissus pour préserver, isoler et pouvoir analyser un maximum de cellules immunitaires et neurales.

Chapitre 2 : Articles

Article 1

An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytometry

J Neurosci Methods. 2015 May 30;247:23-31. doi: 10.1016/j.jneumeth.2015.03.021. Epub 2015 Mar 25

Laurine Legroux, Camille L. Pittet, Diane Beauseigle, Gabrielle Deblois, Alexandre Prat, and Nathalie Arbour

Department of Neurosciences, Université de Montréal, and CRCHUM Montreal, QC, Canada, H2X 0A9

Keywords:

neurons, microglia, macrophages, oligodendrocytes, lymphocytes, flow cytometry

RÉSUMÉ

Contexte : La cytométrie en flux est une technique efficace et puissante pour caractériser et quantifier de nombreuses cellules. Cependant, la force de cette technique n'a pas été largement exploitée dans les neurosciences en raison de l'étape critique de préparation du système nerveux central (SNC) en une suspension de cellules individuelles. Des rapports précédents ont évalué soit les cellules neurales soit les leucocytes infiltrés mais la détection simultanée n'a pas été largement explorée. Nous avons optimisé une préparation tissulaire du SNC pour l'analyse en cytométrie de flux.

Nouvelle méthode : Nous avons soumis le tissu du SNC provenant de souris adultes individuelles à différents protocoles de digestion et de méthodes de Percoll™. Nous avons quantifié et caractérisé par cytométrie en flux les cellules neurales (neurones, oligodendrocytes, microglies) et les leucocytes (macrophages, LT).

Résultats : La méthode utilisant une étape de Percoll™ a augmenté de façon significative le rendement cellulaire comparée à la méthode utilisant un gradient de Percoll™. La digestion à la collagénase D + DNase I a permis la récupération d'un nombre maximal de cellules tout en préservant les marqueurs cellulaires (O4, NeuN, CD45, CD11b, CD3, CD4, CD8) comparée aux digestions avec la papaïne, la trypsine et l'absence de digestion. La combinaison de la digestion avec la collagénase D + DNase I et la méthode utilisant une étape de Percoll™ a été optimale pour la récupération et l'analyse de cellules venant du SNC de souris naïve et ayant l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (modèle de la sclérose en plaques).

Comparaison avec des méthodes existantes : Bien que la cytométrie en flux ne révèle pas la localisation dans le SNC, cette technique permet la quantification simultanée de plusieurs paramètres. Au contraire des autres protocoles, notre nouvelle méthode analyse simultanément les cellules neurales et immunitaires de souris individuelles en santé ou en condition pathologique.

Conclusion : Nous croyons fortement que le champ des neurosciences bénéficiera de l'utilisation optimale de la cytométrie en flux pour élucider les processus physiologiques et pathologiques.

SUMMARY

Background: Flow cytometry is an efficient and powerful technique to characterize and quantify numerous cells. However, the strengths of this technique have not been widely harnessed in neurosciences due to the critical step of CNS tissue preparation into a single cell suspension. Previous reports assessed either neural cells or infiltrating leukocytes but simultaneous detection has not been extensively implemented. We optimized CNS tissue preparation for flow cytometry analysis.

New Method: We subjected CNS tissue from individual adult mice to different digestion protocols and Percoll™ methods. We quantified and characterized by flow cytometry neural cells (neurons, oligodendrocytes, microglia) and leukocytes (macrophages, T lymphocytes).

Results: The one step Percoll™ method significantly increased cell yield compared to the gradient Percoll™ method. The collagenase D+DNase I digestion led to the maximal cell number recovery while preserving cell marker (O4, NeuN, CD45, CD11b, CD3, CD4, CD8) integrity compared to papain, trypsin digestion, and no digestion. The combination of collagenase D+DNase I digestion and one step Percoll™ method was optimal for the recovery and analysis of cells from the CNS of naïve and experimental autoimmune encephalomyelitis (multiple sclerosis model) mice.

Comparison with Existing Method(s): Although flow cytometry does not reveal CNS localization, this technique allows concurrent quantification of multiple parameters. In contrast to other protocols, our novel method simultaneously analyzes neural and immune cells in individual mice in healthy and pathological conditions.

Conclusions: We strongly believe that the field of neurosciences will benefit from an optimal use of flow cytometry to elucidate physiological and pathological processes.

ABBREVIATIONS

B6: C57BL/6

CNS: Central nervous system

CRCHUM: Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal

EAE: Experimental autoimmune encephalomyelitis

APPORT DES AUTEURS AU MANUSCRIT

J'ai effectué toutes les expériences permettant de faire les figures de ce papier. J'ai été formée par les Dre Camille Pittet et Nathalie Arbour pour la manipulation et le sacrifice des souris ainsi que pour les protocoles liés à la cytométrie en flux. Par la suite, Diane Beauseigle et Gabrielle Deblois m'ont aidé dans les sacrifices de souris et/ou pour la préparation des cellules en vue de les analyser en cytométrie de flux. Nous avons collaboré avec le laboratoire du Dr Alexandre Prat pour obtenir certaines solutions ou anticorps. J'ai effectué toutes les analyses de cytométrie; j'ai compilé toutes les données présentées dans le manuscrit. J'ai rédigé la première version du manuscrit. La Dre Nathalie Arbour a entièrement relu, bonifié et corrigé le texte.

1. INTRODUCTION

Flow cytometry is an extremely powerful tool that has numerous applications in basic and clinical research. This technique allows for the simultaneous characterization and quantification of multiple phenotypic and functional parameters within a single cell or a population of cells. Several groups have optimized methods to adequately dissociate tissues into single cells prior to flow cytometry analysis. Embryonic rodent tissues from the central nervous system (CNS) can be efficiently digested and analyzed by flow cytometry (Jungblut et al., 2012; Panchision et al., 2007). For more than two decades, different groups have elaborated strategies to isolate microglia and infiltrating leukocytes from adult rodent CNS tissue despite their high lipidic content (Berghmans et al., 2012; Campanella et al., 2002; Cardona et al., 2006; Dick et al., 1995; Ford et al., 1995; Havenith et al., 1998; Pino and Cardona, 2011; Saura et al., 2003; Sedgwick et al., 1991). Combinations of mechanical and enzymatic digestions (e.g. collagenase, papain, trypsin, DNase) have been applied to dissociate brain and spinal cord tissues (Brewer, 1997; Brewer and Torricelli, 2007; Carson et al., 1998; Juedes and Ruddle, 2001). Traditionally, a Percoll™ gradient has been used to remove cell debris and myelin from these dissociated adult CNS tissue preparations (Allen et al., 1993; Ford et al., 1995; Sedgwick et al., 1991). However, others have used a single 37% (v/v) Percoll™ step to isolate microglia and infiltrating leukocytes (Kivisakk et al., 2009; La Flamme et al., 2003; Liu et al., 2010b; Salem et al., 2011). Percoll™ is a suspension of colloidal silica particles coated with polyvinylpyrrolidone (Pertoft et al., 1978). The low viscosity and low osmolarity of this non-toxic solution has favored its use to isolate cells (Dunkley et al., 2008; Pertoft et al., 1978). Recently, one group has characterized cells of the oligodendrocyte lineage from rodent adult spinal cord samples using flow cytometry (Robinson et al., 2014). Numerous groups routinely investigate the profile of CNS infiltrating immune cells in animal models of neurological diseases such as multiple sclerosis. However, the assessment of both neural cells (e.g. neurons, oligodendrocytes, and microglia) and infiltrating leukocytes (e.g. macrophages, T lymphocytes) from individual mice has not been extensively implemented.

Multiple sclerosis is the prototypic inflammatory disease of the CNS characterized by demyelination, axonal loss, activation of glial cells, and infiltration of immune cells, such as macrophages and T lymphocytes (Miller, 2012). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most common model for this disease (Constantinescu et al., 2011). Although flow cytometry has been extensively used to identify the role of immune cells or molecules in EAE,

this approach has not been broadly exploited to characterize neural cells implicated in this neuroinflammatory disease. Improving the technical tools used to study the targeted organs of animal models of multiple sclerosis as well as other neurological diseases will strengthen our understanding of key pathological mechanisms.

In this manuscript, we present a detailed and optimized protocol to efficiently dissociate CNS tissue from individual mice to assess both neural cells (microglia, neurons and oligodendrocytes) and infiltrating hematopoietic cells (macrophages, CD4 and CD8 T lymphocytes). This protocol successfully improved flow cytometry analysis of these cell populations isolated from both healthy and EAE mice.

2. MATERIALS AND METHODS

2.1 Animals

Female C57BL/6 (B6) mice obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA) were treated in strict adherence with approved protocol (N13043Nas) from the CRCHUM Institutional Committee for the Protection of Animals and the Canadian Council on Animal Care. Animals were used at 6-11 weeks of age.

2.2 Isolation of neural cells

Deeply anesthetized mice were perfused with 50 ml of saline 0.9% (w/v). Brain and spinal cord were collected in Hibernate medium (Life Technologies, Burlington, ON, Canada; catalogue number A12475-01) and kept on ice. These organs from individual mice were minced very finely with a scalpel prior to be subjected to a 15 min digestion in a water-bath at 37°C. Digestion mixes: collagenase D+DNase I, trypsin+DNase I, and papain+DNase I are detailed in Table 1 and were based on other publications and manufacturers' recommendations (Carson et al., 1998; Ji et al., 2013). Prior to its use, papain was activated with EDTA, β -mercaptoethanol and cysteine hydrochloride monohydrate for 30 min at room temperature according to the manufacturer's instructions. To stop the digestion, samples were quickly put on ice. Subsequently, digested CNS tissues were mashed through a 140 μ m mesh screen (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada; catalogue number S3895) fixed in a screen cup (Sigma-Aldrich; catalogue number S1145) using glass tissue grinder pestle (Sigma-Aldrich; catalogue number T8279) to homogenize the mixture. To harvest as many cells as possible, the screen was washed several times with Hibernate medium for a final volume of 10-15 ml per CNS. The homogenate was centrifuged 7 min at 421 \times g and then the supernatant was carefully poured off. To remove myelin, CNS homogenates were subjected to a centrifugation in the presence of Percoll™ in a 15ml tube either as one single solution or in a gradient. For the single Percoll™ concentration, CNS pellets were re-suspended in 10 ml of 37%(v/v) Percoll™ solution (Table 1) and centrifuged 10 min at 500 \times g without brakes. The layer of myelin was sucked off and cell pellet was kept. For the Percoll™ gradient method, CNS pellets were re-suspended in 4 ml of 90% (v/v) Percoll solution, and then additional solutions were carefully layered on top: 3 ml of 60% (v/v) Percoll™, then 4 ml of 37% (v/v) Percoll™ and finally 2-3 ml of HBSS 1X for a final volume of 14.5 ml. The Percoll™ gradient was centrifuged 15 min at 695 \times g without brakes. After centrifugation, three layers were

identified: the top layer contained myelin, the middle layer contained cells, and the bottom layer contained small cell debris. The myelin layer was sucked off and the liquid in the middle layer (approximately 5ml) was harvested. For both types of Percoll™ centrifugations, cells were washed by adding HBSS1 X and centrifuged 10 min at 550 *x g*. Cell pellets were re-suspended, washed with FACS Buffer (Table 1) and centrifuged for 10 min at 421 *x g*. Cell pellets were finally re-suspended in 200 µl of FACS Buffer for flow cytometry staining.

2.3 Flow cytometry

Flow cytometry staining was performed at 4°C, unless otherwise indicated, in V-bottom 96-well plate protected from light. For all washes, cells were centrifuged 4-6 min at 550 *x g*, supernatant flipped off and cell re-suspended by vortexing and then adding fresh FACS buffer (Table 1). Cells were incubated with 25µl of blocking solution (Table 1) for 15 min. Subsequently, 25 µl of the antibody mix (Table 2; fluorochrome-conjugated antibodies recognizing mouse CD45, CD11b, O4, CD3, CD4, CD8) in FACS buffer were added for an overnight incubation. Cells were washed twice prior to being fixed and permeabilized for 10 min at room temperature in 100 µl of PFA/saponin buffer (Table 1). Cells were subsequently washed twice in saponin buffer (Table 1) and then stained in 50 µl of saponin buffer containing the antibody directed at an intracellular antigen (NeuN) for 30 min. Finally, cells were washed twice in saponin buffer and re-suspended in FACS buffer. Cells were transferred into small tubes (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada, catalogue number 223-9391) containing 5 µl of counting beads (Spherotech, Lake Forest, IL, USA; catalogue number ACBP-50-10). Data were acquired on a BD LSRII flow cytometer using the Diva software (BD Biosciences) and data were analyzed using the FlowJo software (Ashland, OR, USA). Appropriate isotype controls were used in all steps. All stainings were compared with isotype controls, and less than 1% non-specific staining was found acceptable. Moreover, fluorescence minus one (FMO) controls were included to ensure appropriate identification of a true positive signal in each channel and adequate gating strategy. Compensation beads (eBioscience Inc. San Diego, CA, USA, catalogue number 01-1111-42) incubated in the presence of the fluorescently labeled antibodies in the same conditions as cell staining were used to determine the appropriate compensation parameters for each flow cytometry acquisition.

2.4 Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) disease induction and scoring

Female B6 mice were immunized subcutaneously with 200 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 (MOG₃₅₋₅₅) peptide (Alpha Diagnostic International, San Antonio, TX, USA; catalogue number: MOG3555-P2-P10) emulsified in incomplete Freund's adjuvant (Difco Laboratoires Detroit, MI, USA; catalogue number 263910) supplemented with 400 µg of *Mycobacterium tuberculosis* H37RA (Difco Laboratories; catalogue number 231141). Two days later, 400 ng of pertussis toxin (List Biological Laboratories, Campbell, CA, USA; catalogue number 181) was injected intraperitoneally. Animals were scored according to the following scale: 0=normal, 1=limp tail, 2= slow righting-reflex, 3=paralysis of one hind limb, 3.5=paralysis of one hind limb and weakness in second hind limb, 4= paralysis of both hind limbs, 4.5=paralysis of both hind limbs and weakness in forelimbs, 5=moribund.

2.5 Statistical analysis

We repeated each experimental condition with at least four individual mice and analyzed the data with the GraphPad Prism software (San Diego, CA). Results are represented as mean and standard error of the mean (SEM). Values were considered statistically significant when probability (p) values were equal or below 0.05 (*), 0.01 (**), or 0.001 (***). To compare two groups (one step vs. gradient Percoll; no digestion vs. collagenase D+DNase I; naïve vs. EAE mice) we used an unpaired Student t-test. For comparison of four digestion protocols, we used a two-way analysis of variance (ANOVA) and a Bonferroni post-test analysis.

3. RESULTS

3.1 Optimization of the Percoll™ step for the concurrent isolation of neural cells and leukocytes from adult mouse brain and spinal cord.

Brain and spinal cord homogenates of individual adult mice were digested with collagenase D+DNase I for 15 min at 37°C and then subsequently centrifuged using either a Percoll™ gradient (90%-60%-37%) or a single 37% Percoll™ step as described in the methods. Harvested cells were washed, and separated into two tubes for flow cytometry staining using fluorescently labeled antibodies (Table 2). The first sample was stained for cellular markers: NeuN (neuron), O4 (oligodendrocyte), CD45 (leukocyte), CD11b (myeloid cell) (Fig.1A) whereas the second sample was stained for appropriate isotype controls (data not show). The position of each gate was determined for each treatment based on the corresponding isotype control. NeuN is a nuclear protein specifically detected in neurons of the CNS and the peripheral nervous system of vertebrates (Mullen et al., 1992; Wolf et al., 1996). O4 is an oligodendrocyte lineage marker detected from the late progenitor stage and persisting throughout cell maturation (Sommer and Schachner, 1981). CD45, a trans membrane glycoprotein, is expressed by all hematopoietic cells except erythrocytes (Lai et al., 1998); neurons and oligodendrocytes do not express this marker. CD11b, an integrin family member, is expressed by myeloid cells (Springer et al., 1979) including monocytes, microglia and macrophages.

Just prior to flow cytometry acquisition, beads of a distinct size compared to cells (green gate Fig. 1A) were added into each tube for cell number quantification. Numbers of cells per CNS sample were obtained by normalizing and extrapolating based on the 5,000 beads added to each acquisition tube. Cells were analyzed according to their granularity (SSC-A) and size (FSC-A) (Fig.1A first panel). The SSC-A channel was acquired on the log scale to allow detection of all events. Only single cell events were considered; events corresponding to two or more cells passing together and thus having twice the width of a single cell (FSC-W) were not included in the analysis (Fig.1A second panel). Single cells were analyzed for different markers discriminating distinct neural and immune cell populations (Fig 1A third panel). Cells not expressing CD45 (pink gate) were further analyzed for the expression of O4 and NeuN, (Fig. 1A last panel). Amongst the CD45 expressing cells (blue and orange gates), two populations expressing CD11b were observed (blue gates): CD11b⁺CD45^{intermediate} cells corresponding to microglia, and CD11b⁺CD45^{high} cells corresponding to macrophages and activated microglia (Jin

et al., 2007; Lauterbach et al., 2006). Finally, cells expressing CD45 but not CD11b (orange gate) were identified as other leukocytes. As expected, in naïve animals very few macrophages/activated microglia or other leukocytes were observed (Fig. 1). Although, we could similarly detect neural cells (neurons, oligodendrocytes, and microglia) and leukocytes (macrophages and other leukocytes) following both Percoll™ methods (Fig. 1A), very different cell numbers and percentages were obtained (Fig. 1B). Indeed, we could analyze from individual mouse CNS samples 1.96 million cells on average (data from 5 individual mice) following the one step Percoll™ method compared to only 129 000 cells following the Percoll™ gradient method (Fig. 1B). Overall, cells from all subsets were significantly more abundant following the one step method, but neural cells (neurons and oligodendrocytes) were recovered in even greater numbers (Fig. 1B). Whereas 40,000 neural cells identified as CD45⁻CD11b⁻ were harvested from the gradient method, 1.6 million cells were collected from the one step method (Fig. 1B). These neural cells included 400,000 neurons and 1.08 million oligodendrocytes in the one step method samples, but only 5,600 neurons and 15,200 oligodendrocytes in the gradient method counterparts. The hematopoietic cells (CD45⁺) were also more abundant following the one step method (320,000 cells vs. 82,000 cells) and these increased values were also reflected in the number of microglia (284,000 vs. 76,000) and macrophages/activated microglia (6,000 vs. 1,200) analyzed (Fig. 1B). The one step method allowed a significantly superior enrichment of neural cells in the total cell population harvested (Fig. 1B, right panel). Indeed, the percentage of non-myeloid neural cells (oligodendrocytes and neurons) shifted from 29% to 80% of the total harvested cells (Fig. 1B). If isolation of leukocyte subsets by flow cytometry sorting is planned, an enrichment step using CD45 labeled beads could remove these abundant neural cells prior to sorting microglia, macrophages or other leukocyte subsets. We can conclude that the one step Percoll™ method allows the recovery and analysis of a greater number of neural and hematopoietic cells than the gradient method and that samples from individual mice could be routinely analyzed.

3.2 Collagenase D+ DNase I digestion improves neural and immune cell recovery compared to other digestions.

We explored whether the digestion step could also be optimized for the simultaneous flow cytometry analysis of neural cells and leukocytes. Other groups have previously reported that

collagenase, trypsin or papain could successfully digest adult CNS tissues (Brewer and Torricelli, 2007; Carson et al., 1998; Ford et al., 1995; Juedes and Ruddle, 2001; Oliver-De la Cruz and Ayuso-Sacido, 2012; Sedgwick et al., 1991). We compared four digestion protocols on mouse brain and spinal cord homogenates: no digestion, collagenase D+DNase I, papain+DNase I and trypsin+DNase I digestion. Cells were subsequently isolated from these digested CNS homogenates using the one step Percoll™ method. Finally, cells were stained, analyzed by flow cytometry for the same markers (CD45, CD11b, O4 and NeuN) as previously described (Fig.1), and quantified using beads. To avoid any inter-assay variation, samples were processed, stained and analyzed on the same day. The side-by-side comparison of these four methods demonstrated important differences in the detection (Fig. 2A) and the number of cells recovered (Fig. 2B). The total number of cells harvested from the collagenase D+DNase I samples (5 individual mice per group) was 2 to 5 fold greater than those obtained from either undigested, papain+DNase I or trypsin+DNase I digested samples (Fig. 2B). Although the number of microglia recovered (from 187,200 to 283,200 cells) was similar between the different treatments, the number of other neural cells (CD45⁻CD11b⁻) was significantly augmented in the collagenase+DNase I samples (1.6 million cells) compared to the other groups (from 186,000 to 750,000 cells). This difference was reflected in the number of oligodendrocytes recovered, which was over 1.08 million cells in the collagenase+DNase I treatment vs. 157,200 to 505,200 cells for the other conditions (Fig. 2B). Whereas NeuN⁺ cells were easily identified following either no digestion or collagenase D+DNase I digestion, these cells were very difficult to detect following the trypsin+DNase I or the papain+DNase I digestion steps (Fig. 2A). Overall, the collagenase D+DNase I digestion increased the number of neural cells recovered from adult mouse CNS tissues, especially neurons and oligodendrocytes, without affecting the number of microglia (CD11b⁺CD45^{intermediate}) and macrophages/activated microglia (CD11b⁺CD45^{high}) harvested.

The ultimate goal of our laboratory is to simultaneously analyze neural cells and infiltrating leukocytes in animal models of CNS inflammatory diseases. In the literature, T lymphocytes are classically isolated from undigested CNS tissues (Deb and Howe, 2009; Pino and Cardona, 2011). Therefore, we tested whether collagenase D+ DNase I was also optimal to recover leukocytes during an ongoing CNS inflammatory disease. A massive leukocyte infiltration is routinely detected in the CNS of mice suffering from EAE (Stromnes and Goverman, 2006a). CNS tissues from EAE mice having the same clinical score (3) were either

undigested or digested with collagenase D+DNase I followed by the one step Percoll™ method. Isolated cells were labeled for CD45, CD11b, NeuN, and O4, but also for T lymphocyte markers: CD3, CD4 and CD8 (Fig. 3). The gating strategy was the same as previously elaborated (Fig. 1-2). CD45^{high} CD11b⁻ cells were further analyzed for CD3, and then CD4 and CD8 expression. CD3 proteins are trans membrane proteins complexed with the T Cell Receptor (TCR) expressed on thymocytes, mature T lymphocytes, and NK-T cells (Dave, 2009); the antibody used for this study targets the CD3ε subunit of this complex. CD4 and CD8 are trans membrane glycoproteins present on CD4 and CD8 T lymphocyte subsets respectively (Germain, 2002). CD11b⁻ CD45^{high} CD3⁺ cells correspond to all CD3 T lymphocytes, whereas CD11b⁻ CD45^{high} CD3⁺ CD4⁺ cells identify CD4 T lymphocytes and CD11b⁻ CD45^{high} CD3⁺ CD8⁺ cells label CD8 T lymphocytes. We could easily discriminate and analyze the different hematopoietic cell subsets: microglia, macrophages/activated microglia, and CD3, CD4 and CD8 T lymphocytes from samples processed with both tested protocols (Fig. 3A). The number of hematopoietic cells was more than 2 fold greater in the collagenase D+DNase I samples (3.8 million cells) compared to the undigested ones (1.5 million cells) (Fig. 3B). Similarly, activated microglia/macrophages, CD3, CD4 and CD8 T lymphocytes were 2-3 fold more abundant in the collagenase D+DNase I samples compared to the undigested counterparts (Fig. 3B). As expected, the number of hematopoietic cells, especially macrophages/activated microglia and other leukocytes (including T lymphocytes) was significantly elevated in EAE mice compared to naïve animals (Fig. 4). In contrast, the number of neural cells (microglia, neurons and oligodendrocytes) was similar in naïve and EAE mice (Fig.4). We can conclude that the combination of collagenase D+DNase I and one-step Percoll™ method improved the recovery of leukocytes including macrophages/activated microglia and T lymphocytes from healthy and inflamed CNS samples. Therefore, using our optimized technique we can simultaneously analyze neural cells (microglia, neurons and oligodendrocytes) and CNS infiltrating leukocytes (macrophages, CD8 and CD4 T lymphocytes) from individual non-diseased or EAE mice.

4. DISCUSSION

We have optimized a CNS tissue preparation protocol using collagenase D + DNase I digestion coupled with a one-step Percoll™ method that permits maximal cell yield and optimal detection of both neural cells (neurons, oligodendrocytes, microglia) and infiltrating leukocytes (macrophages, T lymphocytes) from individual mice. We uncovered that the one-step Percoll™ method increases the number of cells recovered by 15 fold compared to the Percoll™ gradient method (Fig. 1). One group has also reported that the linear Percoll separation is superior to the Percoll gradient to recover cells of the oligodendrocyte lineage from mouse CNS (Robinson et al., 2014). We found that amongst several digestion conditions (papain+DNase I, trypsin+DNase I, collagenase D+DNase I, and none), the collagenase D+DNase I step allowed the best cell number recovery (Fig. 2) while maintaining the efficient detection of numerous cell markers (O4, NeuN, CD45, CD11b, CD3, CD4, CD8). Similarly to our results, Robinson and colleagues obtained the highest cell yield using Accutase, a commercially available mix of proteolytic and collagenolytic enzymes, and other collagenase-based commercial solutions (e.g. Liberase), compared with undigested tissues, or trypsin or papain digested tissues (Robinson et al., 2014). Specific neural cell subsets were more affected by harsher digestion protocols such as papain+DNase I and trypsin+DNase I (Fig. 2). The number of microglia recovered from the different enzyme mixes was similar (Fig. 2). In contrast, papain+DNase I and trypsin+DNase I digestions dramatically affected the recovery of oligodendrocytes and neurons (Fig. 2); both cell subsets are notoriously known for their enhanced susceptibility to stress and damage compared to microglia (Jansen et al., 2014). Although Robinson and colleagues counted cells using a different method (Coulter Counter) (Robinson et al., 2014), we obtained a similar cell yield using beads in our flow cytometry acquisition. We harvested on average 2 million cells per CNS sample from individual naïve female adult mice (Fig. 1-2). Our cell counting method does not require additional equipment and can easily be performed concurrently with the flow cytometry acquisition. In contrast to our observations, Robinson and colleagues could still detect oligodendroglial antigens such as O4 following the papain digestion (Robinson et al., 2014). This discrepancy could be due to differences in procedures; the authors did not specify whether papain was activated prior to its use, and DNase I was also not present in their digestion mixes (Robinson et al., 2014). We used a shorter digestion time (15 min vs. 30 min) than this group. Moreover, others reported that O4 is an antigen sensitive to papain or trypsin digestion (Oliver-

De la Cruz and Ayuso-Sacido, 2012). When we increased the digestion time with collagenase D+DNase I up to 30 min, we observed an important decrease in the number of neurons and oligodendrocytes harvested (data not show), supporting the notion that both selected enzymes and digestion time are critical to harvest the maximal number of cells while preserving cell integrity.

We found that the combination of the collagenase D+DNase I digestion and the one step Percoll™ method is more efficient than other digestions or the gradient method to recover hematopoietic cells, including infiltrating leukocytes such as macrophages and T lymphocytes (Fig. 1-4). Even in naïve mice, a small but detectable number of myeloid (CD11b⁺) and non-myeloid (CD45⁺CD11b⁻) leukocytes were reliably detected by flow cytometry in accordance with the continuous monitoring of the CNS by blood-borne immune cells such as T lymphocytes (Hussain et al., 2014; Ousman and Kubes, 2012). Although T lymphocytes do not have extensive cell processes as do neural cells (e.g. neurons, microglia or oligodendrocytes), the collagenase D+DNase I digestion improved the number of T lymphocytes (820,000 vs. 300,000) as well as the number of total non-myeloid leukocytes (CD45⁺CD11b⁻ cells: 1.04 million vs. 420,000) recovered from the CNS of EAE mice compared to the undigested protocol (Fig. 3). We suggest that the collagenase D digestion+DNase I step facilitates the recovery of immune cells that have infiltrated not only the perivascular space, but also the CNS parenchyma. Importantly, we also validated that the collagenase D+DNase I digestion does not affect the detection of numerous immune markers (KLRG1, NKG2D, TCR beta chain, CD44, CD62L, NK1.1, CD127, TCR gamma/delta) by comparing splenocytes from undigested vs. collagenase D+DNase I digested organs (data not shown). As expected and observed in numerous studies of CNS injury models (EAE/neuropathic pain) (Berghmans et al., 2012; Cao et al., 2012), the number of hematopoietic cells was dramatically increased in EAE mice (3.8 millions) compared to naïve animals (310,000 cells) (Fig. 4). For the isolation of hematopoietic cells by flow cytometry sorting from CNS tissues, a pre-enrichment step could be worthwhile. Indeed, as more neural cells (neurons, oligodendrocytes) were harvested from our optimal protocol (Fig. 1), the proportion of hematopoietic cells (68% vs. 17%) including microglia (63% vs. 15%) within the total number of cells decreased compared to the gradient step. However, the significantly augmented number of cells recovered using our method could largely compensate for the necessity to perform this pre-enrichment step.

In contrast to the hematopoietic cells, the number of neurons and oligodendrocytes were similar between EAE and naïve mice (Fig. 4). Robinson and colleagues analyzed the oligodendroglia populations in the spinal cord of EAE animals and observed that the number of O4⁺ cells, which includes late oligodendrocyte progenitors as well as pre-myelinating and myelinating oligodendrocytes, was increased at the peak of disease compared to naïve animals. These observations were mainly due to the augmented number of late progenitor cells (Robinson et al., 2014). In future studies, it will be relevant to include antibodies targeting additional markers to distinguish oligodendrocytes at different stages of differentiation.

In several studies, experimental animals have been pooled to obtain sufficient numbers of cells to perform flow cytometry analysis (Berghmans et al., 2012; Cao et al., 2012; Phares et al., 2009). Some groups did not enzymatically digest CNS tissues (Berghmans et al., 2012; Cao et al., 2012); others digested samples with trypsin (Phares et al., 2009). Moreover, these groups got rid of myelin and cell debris using the Percoll™ gradient step (Berghmans et al., 2012; Cao et al., 2012; Jin et al., 2007; Phares et al., 2009). We have shown that these protocols do not lead to the highest cell yield from CNS tissues. Others counted approximately 440,000 microglia (CD45^{intermediate} CD11b⁺) from 5-6 pooled CNS (brain+spinal cord) samples from naïve mice following the collagenase digestion and Percoll gradient step (Jin et al., 2007). Similarly, we obtained on average 77,000 microglia per animal (Fig. 1) using the Percoll gradient but 284,000 microglia per animal using our optimized method (Fig. 1). Although our protocol allows the analysis of individual mice, it may become necessary to pool tissues from multiple mice when specific CNS areas such as the spinal cord or the lumbar spinal cord are studied (Cao et al., 2012; Phares et al., 2009).

Overall, our optimized method allows for the simultaneous quantification and characterization of parameters and functions of both neural and immune cells in individual mice during normal physiological conditions or ongoing neurological diseases.

ACKNOWLEDGEMENTS

This study was supported by an operating grant from the Multiple Sclerosis Society of Canada (MSSOC). L.L. holds a studentship from the MSSOC. A.P. holds a Senior Scholar Award of the Fonds de Recherche du Québec-Santé. N.A. holds a New Investigator Salary Award from the Canadian Institutes of Health Research. We thank the flow cytometry core facility of the CRCHUM. The authors are thankful to Negar Farzam-kia for revision of the final manuscript.

REFERENCES

- Allen SJ, Baker D, O'Neill JK, Davison AN, Turk JL. Isolation and characterization of cells infiltrating the spinal cord during the course of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Biozzi AB/H mouse. *Cellular immunology*, 1993; 146: 335-50.
- Berghmans N, Heremans H, Li S, Martens E, Matthys P, Sorokin L, Van Damme J, Opdenakker G. Rescue from acute neuroinflammation by pharmacological chemokine-mediated deviation of leukocytes. *Journal of neuroinflammation*, 2012; 9: 243.
- Brewer GJ. Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience methods*, 1997; 71: 143-55.
- Brewer GJ, Torricelli JR. Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nature protocols*, 2007; 2: 1490-8.
- Campanella M, Sciorati C, Tarozzo G, Beltramo M. Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke; a journal of cerebral circulation*, 2002; 33: 586-92.
- Cao L, Beaulac H, Eurich A. Differential lumbar spinal cord responses among wild type, CD4 knockout, and CD40 knockout mice in spinal nerve L5 transection-induced neuropathic pain. *Molecular pain*, 2012; 8: 88.
- Cardona AE, Huang D, Sasse ME, Ransohoff RM. Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. *Nature protocols*, 2006; 1: 1947-51.
- Carson MJ, Reilly CR, Sutcliffe JG, Lo D. Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia*, 1998; 22: 72-85.
- Constantinescu CS, Farooqi N, O'Brien K, Gran B. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *British journal of pharmacology*, 2011; 164: 1079-106.
- Dave VP. Hierarchical role of CD3 chains in thymocyte development. *Immunological reviews*, 2009; 232: 22-33.
- Deb C, Howe CL. Functional characterization of mouse spinal cord infiltrating CD8+ lymphocytes. *Journal of neuroimmunology*, 2009; 214: 33-42.
- Dick AD, Ford AL, Forrester JV, Sedgwick JD. Flow cytometric identification of a minority population of MHC class II positive cells in the normal rat retina distinct from CD45^{low}CD11b/c⁺CD4^{low} parenchymal microglia. *The British journal of ophthalmology*, 1995; 79: 834-40.
- Dunkley PR, Jarvie PE, Robinson PJ. A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat Protoc*, 2008; 3: 1718-28.
- Ford AL, Goodsall AL, Hickey WF, Sedgwick JD. 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. *Journal of immunology*, 1995; 154: 4309-21.

Germain RN. T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature reviews. Immunology*, 2002; 2: 309-22.

Havenith CE, Askew D, Walker WS. Mouse resident microglia: isolation and characterization of immunoregulatory properties with naive CD4+ and CD8+ T-cells. *Glia*, 1998; 22: 348-59.

Hussain RZ, Hayardeny L, Cravens PC, Yarovinsky F, Eagar TN, Arellano B, Deason K, Castro-Rojas C, Stuve O. Immune surveillance of the central nervous system in multiple sclerosis - Relevance for therapy and experimental models. *Journal of neuroimmunology*, 2014; 276: 9-17.

Jansen AH, Reits EA, Hol EM. The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Frontiers in molecular neuroscience*, 2014; 7: 73.

Ji Q, Castelli L, Goverman JM. MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8(+) T cells. *Nat. Immunol.*, 2013; 14: 254-61.

Jin YH, Mohindru M, Kang MH, Fuller AC, Kang B, Gallo D, Kim BS. Differential virus replication, cytokine production, and antigen-presenting function by microglia from susceptible and resistant mice infected with Theiler's virus. *Journal of virology*, 2007; 81: 11690-702.

Juedes AE, Ruddle NH. Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*, 2001; 166: 5168-75.

Jungblut M, Tiveron MC, Barral S, Abrahamsen B, Knobel S, Pennartz S, Schmitz J, Perraut M, Pfrieger FW, Stoffel W, Cremer H, Bosio A. Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1. *Glia*, 2012; 60: 894-907.

Kivisakk P, Imitola J, Rasmussen S, Elyaman W, Zhu B, Ransohoff RM, Khoury SJ. Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of neurology*, 2009; 65: 457-69.

La Flamme AC, Ruddenklau K, Backstrom BT. Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infection and immunity*, 2003; 71: 4996-5004.

Lai L, Alaverdi N, Maltais L, Morse HC, 3rd. Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *J. Immunol.*, 1998; 160: 3861-8.

Lauterbach H, Zuniga EI, Truong P, Oldstone MB, McGavern DB. Adoptive immunotherapy induces CNS dendritic cell recruitment and antigen presentation during clearance of a persistent viral infection. *The Journal of experimental medicine*, 2006; 203: 1963-75.

Liu Y, Bando Y, Vargas-Lowy D, Elyaman W, Khoury SJ, Huang T, Reif K, Chitnis T. CD200R1 agonist attenuates mechanisms of chronic disease in a murine model of multiple sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*, 2010; 30: 2025-38.

Miller E. Multiple sclerosis. *Advances in experimental medicine and biology*, 2012; 724: 222-38.

Mullen RJ, Buck CR, Smith AM. NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development*, 1992; 116: 201-11.

Oliver-De la Cruz J, Ayuso-Sacido A. Neural Stem Cells from Mammalian Brain: Isolation Protocols and Maintenance Conditions. In Sun T, editor. *Neural Stem Cells and Therapy*. In Tech, 2012: 3-30.

Ousman SS, Kubes P. Immune surveillance in the central nervous system. *Nature neuroscience*, 2012; 15: 1096-101.

Panchision DM, Chen HL, Pistollato F, Papini D, Ni HT, Hawley TS. Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24. *Stem cells*, 2007; 25: 1560-70.

Pertoft H, Laurent TC, Laas T, Kagedal L. Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Analytical biochemistry*, 1978; 88: 271-82.

Phares TW, Ramakrishna C, Parra GI, Epstein A, Chen L, Atkinson R, Stohlman SA, Bergmann CC. Target-dependent B7-H1 regulation contributes to clearance of central nervous system infection and dampens morbidity. *J Immunol*, 2009; 182: 5430-8.

Pino PA, Cardona AE. Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using percoll gradients. *Journal of visualized experiments : JoVE*, 2011: pii: 2348.

Robinson AP, Rodgers JM, Goings GE, Miller SD. Characterization of oligodendroglial populations in mouse demyelinating disease using flow cytometry: clues for MS pathogenesis. *PloS one*, 2014; 9: e107649.

Salem M, Mony JT, Lobner M, Khorooshi R, Owens T. Interferon regulatory factor-7 modulates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Journal of neuroinflammation*, 2011; 8: 181.

Saura J, Tusell JM, Serratosa J. High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia*, 2003; 44: 183-9.

Sedgwick JD, Schwender S, Imrich H, Dorries R, Butcher GW, ter Meulen V. Isolation and direct characterization of resident microglial cells from the normal and inflamed central nervous system. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 1991; 88: 7438-42.

Sommer I, Schachner M. Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Developmental biology*, 1981; 83: 311-27.

Springer T, Galfre G, Secher DS, Milstein C. Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *European journal of immunology*, 1979; 9: 301-6.

Stromnes IM, Goverman JM. Active induction of experimental allergic encephalomyelitis. *Nat Protoc*, 2006; 1: 1810-9.

Wolf HK, Buslei R, Schmidt-Kastner R, Schmidt-Kastner PK, Pietsch T, Wiestler OD, Blumcke I. NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*, 1996; 44: 1167-71.

TABLES

Table 1: Solutions used to process CNS tissues and cells

Solution		Concentration	Company ¹ (catalogue number)
HBSS 1X	HBSS (Hank's Balanced Salt Solution) 10X	10% (v/v)	Wisent Bioproducts (311506CL)
	Sodium bicarbonate	0.075% (w/v)	Wisent Bioproducts (609-105-EL)
	Sterile deionized distilled H ₂ O	Complement volume (90% v/v)	
Collagenase D+DNase I in HBSS 1X	Collagenase D	2 mg/ml	Roche Diagnostic (11088866001)
	DNase I	14 µg/ml (28U/ml)	Roche Diagnostic (11284932001)
Papain+DNase I in HBSS1 X	Papain	1 mg/ml	Worthington (LS003119)
	EDTA	1.1 mM	Wisent Bioproducts (625060CG)
	β-mercaptoethanol	0.067 mM	Sigma-Aldrich (M6250)
	Cysteine hydrochloride monohydrate	5.5 mM	Fisher Scientific (BP376)
	DNase I	14 µg/ml (28U/ml)	Roche Diagnostic (11284932001)
Trypsin+DNase I in HBSS1X	Trypsin	0.25% (v/v)	Wisent Bioproducts (325044EL)
	DNase I	20 µg/ml (40U/ml)	Roche Diagnostic (11284932001)
Percoll™ 37% (v/v)	HBSS 10X	10% (v/v)	Wisent Bioproducts (311506CL)
	Percoll™	37% (v/v)	VWR International (17-0891-01)

	Sterile deionized distilled H ₂ O	Complement volume (53% v/v)	
Percoll™ 90% (v/v)	HBSS 10X	10% (v/v)	Wisent Bioproducts (311506CL)
	Percoll™	90% (v/v)	VWR International (17-0891-01)
Percoll™ 60% (v/v)	HBSS 10X	10% (v/v)	Wisent Bioproducts (311506CL)
	Percoll™	60% (v/v)	VWR International (17-0891-01)
	Sterile deionized distilled H ₂ O	Complement volume (30% v/v)	
PBS pH7.4	NaCl	13.7 mM	Wisent Bioproducts (600082WG)
	KCl	0.27 mM	Wisent Bioproducts (600075QC)
	Na ₂ HPO ₄	1 mM	Wisent Bioproducts (600086CG)
	KH ₂ PO ₄	0.2 mM	Sigma-Aldrich (P0662)
FACS buffer in PBS	Fetal bovine serum	1% (w/v)	Wisent Bioproducts (080-450)
	Sodium azide	0.1% (v/v)	Sigma-Aldrich (S2002)
Blocking solution in FACS Buffer	Normal mouse immunoglobulins	0.3 mg/ml	Life Technologies (10400L)
	Rat anti mouse CD16/CD32	0.02 ug/ml	BD Biosciences (553142)
PFA/Saponin Buffer in PBS	Paraformaldehyde	4% (w/v)	Sigma-Aldrich (P6148)
	HEPES	10 mM	Sigma-Aldrich (H3375)
	Saponin	0.1% (w/v)	Sigma-Aldrich (S7900)
Saponin Buffer in	Saponin	0.1% (w/v)	Sigma-Aldrich (S7900)

PBS	Fetal bovine serum	1% (v/v)	Wisent Bioproducts (8045)
	Sodium azide	0.1% (w/v)	Sigma-Aldrich (S2002)

¹Wisent Bioproducts, Saint Bruno, QC, Canada; VWR International, Town of Mont-Royal, QC, Canada; Roche Diagnostic, Laval, QC, Canada; Worthington, Lakewood, NJ, USA; BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada

Table 2: Antibodies used for flow cytometry analysis

Targeted antigen-fluorochrome	Clone	Concentration used	Company¹
CD45 PE-Cy TM 7	30-F11	0.8 ug/ml	BD Biosciences
CD11b Alexa Fluor [®] 700	M1/70	4 ug/ml	BD Biosciences
O4 Allophycocyanin	O4	2.2 ug/ml	Miltenyi Biotec
NeuN Alexa Fluor [®] 488	A60	20 ug/ml	Millipore
CD3 Peridin-chlorophyll protein-Cy5.5 (PerCP-Cy5.5)	145-2C11	2 ug/ml	BD Biosciences
CD8 Pacific Blue TM	53-6.7	2 ug/ml	BD Biosciences
CD4 Phycoerythrin	RM4-5	8 ug/ml	BD Biosciences

¹ Miltenyi Biotec, San Diego, CA, USA; Millipore, Etobicoke, ON, Canada

FIGURES

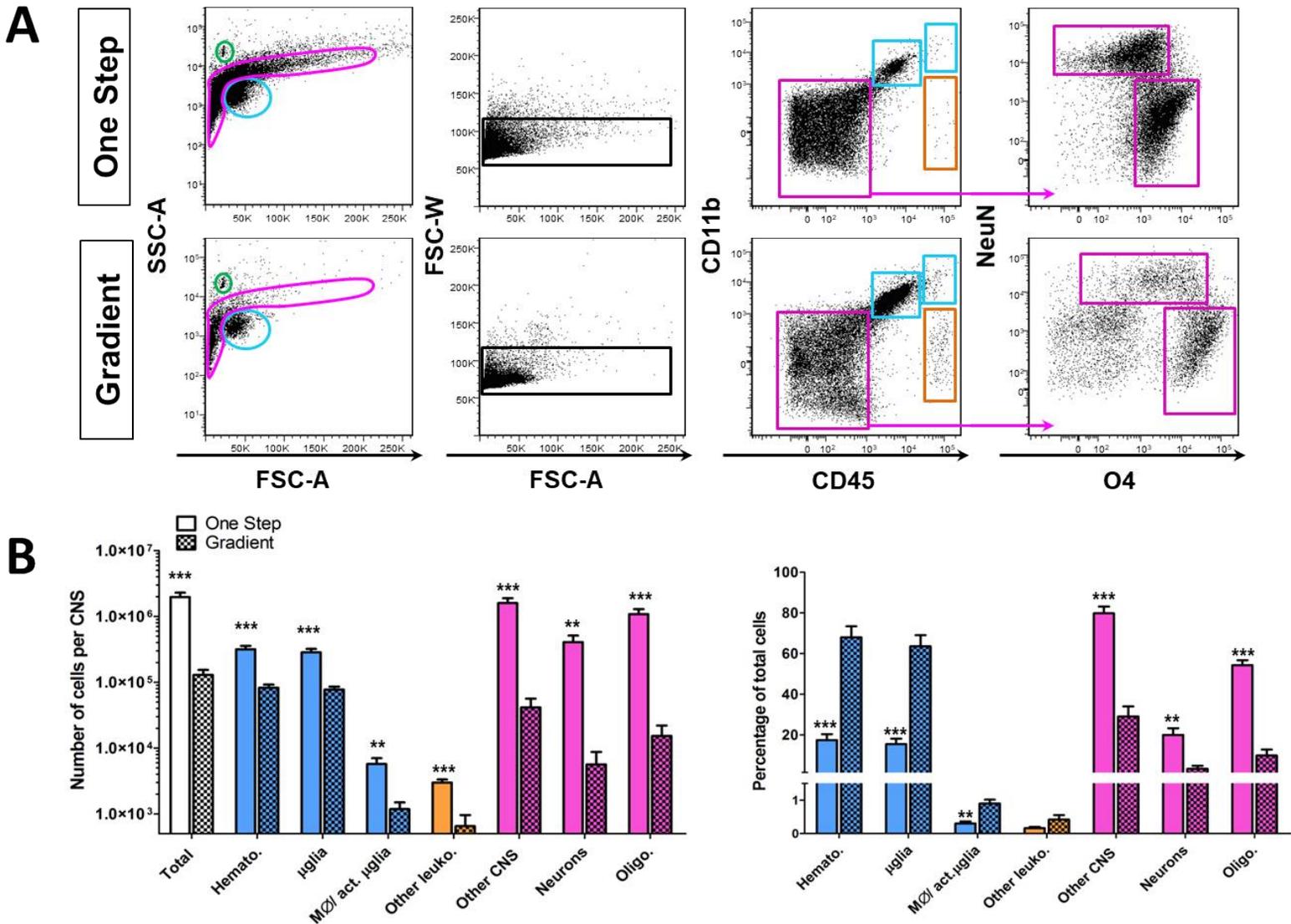


Figure 1: Optimization of the Percoll™ step for the simultaneous isolation of neural cells and leukocytes from adult mouse brain and spinal cord.

CNS (brain and spinal cord) tissues from individual naïve mice were digested with collagenase D+DNase I and then cells were isolated using either the one-step Percoll™ method (One Step) or the Percoll™ gradient method (Gradient). Cells were subsequently stained for CD45, CD11b, O4 and NeuN and analyzed by flow cytometry. The number of cells was calculated and normalized using beads added prior to flow cytometry acquisition. A) Representative dot plots for both

techniques show the typical gating on the FSC-A vs. SSC-A profile for hematopoietic cells (microglia, macrophages and other leukocytes) in blue, for other neural cells (neurons, oligodendrocytes) in pink, and for beads in green. Only single cell events were analyzed as illustrated on the second dot plot depicting the FSC-W vs. FSC-A data where events greater than twice the average size were excluded. CD45 negative cells (pink gates) were further analyzed for the presence of NeuN or O4. CD45 expressing cells (blue and orange gates) were subdivided into subsets including microglia ($CD45^{intermediate} CD11b^+$), activated microglia + macrophages ($CD45^{high} CD11b^+$) and non-myeloid leukocytes ($CD45^{high} CD11b^-$). B) The number of cells per CNS sample (left panel) and the percentage of each subset within the total cells (right panel) recovered from both methods are presented as mean \pm SEM. These results were obtained from 5 mice per group. The total number of cells recovered from the one step Percoll™ method was 15 fold greater than from the Percoll™ gradient method. The cell yield was significantly increased for all cell subsets. *** $p < 0.001$, ** $p < 0.01$. Total: total cells; Hemato: hematopoietic cells; μ glia: microglia cells; M \emptyset /act. μ glia: macrophages/activated microglia cells; Other leuko: other leukocytes than microglia and macrophages; Other CNS: other neural cells than microglia; Oligo: oligodendrocytes cells.

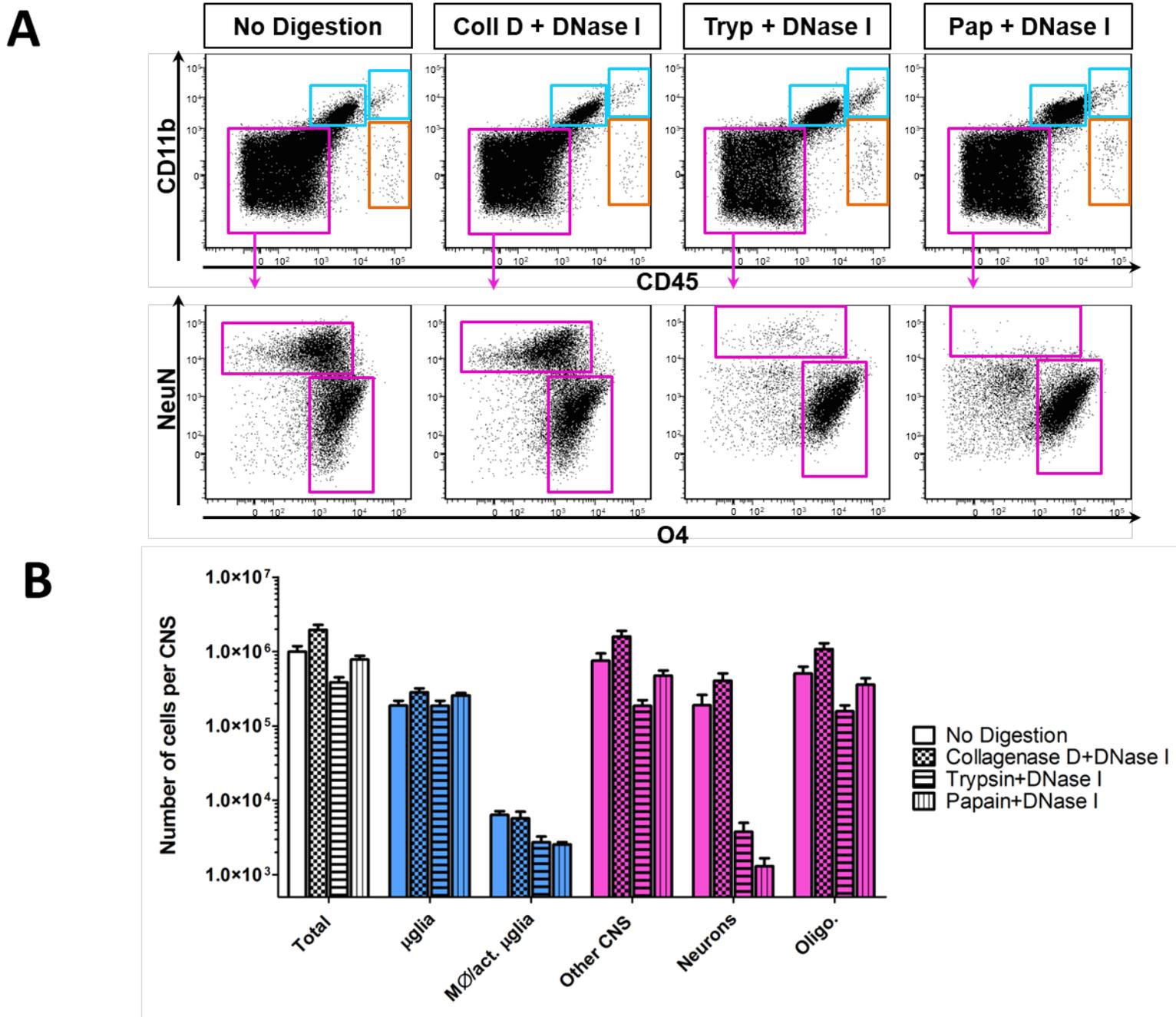


Figure 2: Collagenase D+DNase I digestion increases the recovery of neural cells.

CNS (brain and spinal cord) tissues from individual naïve mice were either undigested (no digestion) or digested for 15 min in the presence of collagenase D+DNase I (Coll D +Dnase I), trypsin+DNase I (Tryp +DNase I), or papain+DNase I (Pap+Dnase I) as indicated. Cells were subsequently isolated using the one step Percoll™ method and then stained for CD45, CD11b,

O4 and NeuN. The number of cells per CNS was calculated and normalized using beads. A) Representative dot plots show the typical gating for hematopoietic cells (microglia, macrophages in blue and other leukocytes in orange) and for other neural cells (neurons, oligodendrocytes in pink). CD45 negative events were analyzed for the expression of NeuN and O4 (second row of dot plots). All cell subsets were easily detected in undigested or collagenase D+DNase I digested samples. In contrast, trypsin+DNase I and papain+DNase I digestions impeded the detection of NeuN expressing cells. B) The number of cells per CNS sample recovered from each technique is illustrated as mean \pm SEM for 5 individual mice per group. The total number of cells recovered from the collagenase D+DNase I samples was significantly greater than any other digestion protocols; similarly, the cell yield was significantly increased for non-microglial neural cells and oligodendrocytes. The number of myeloid cells recovered was similar between all treatments. However, the number of neurons was drastically reduced in both trypsin+DNase I and papain+DNase I digestion groups. Comparison of the collagenase D+DNase I vs. all other treatments: *** $p < 0.001$, * $p < 0.05$. Total: total cells; μ glia: microglia cells; M ϕ /act. μ glia: macrophages/activated microglia cells; Other leuko: leukocytes other than microglia and macrophages; Other CNS: neural cells other than microglia; Oligo: oligodendrocytes.

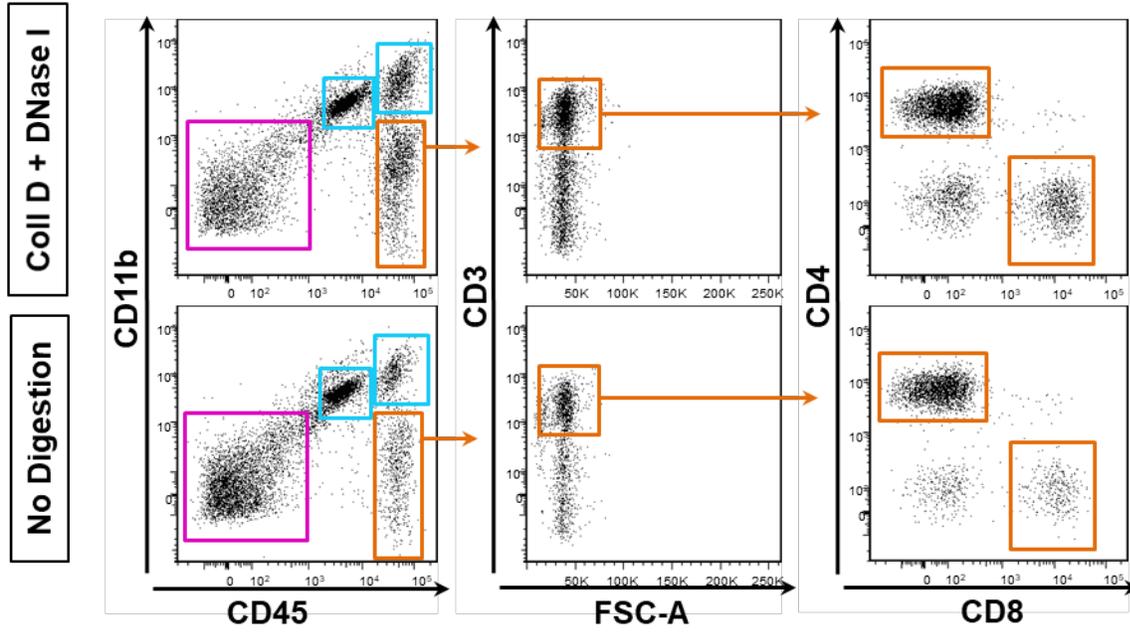
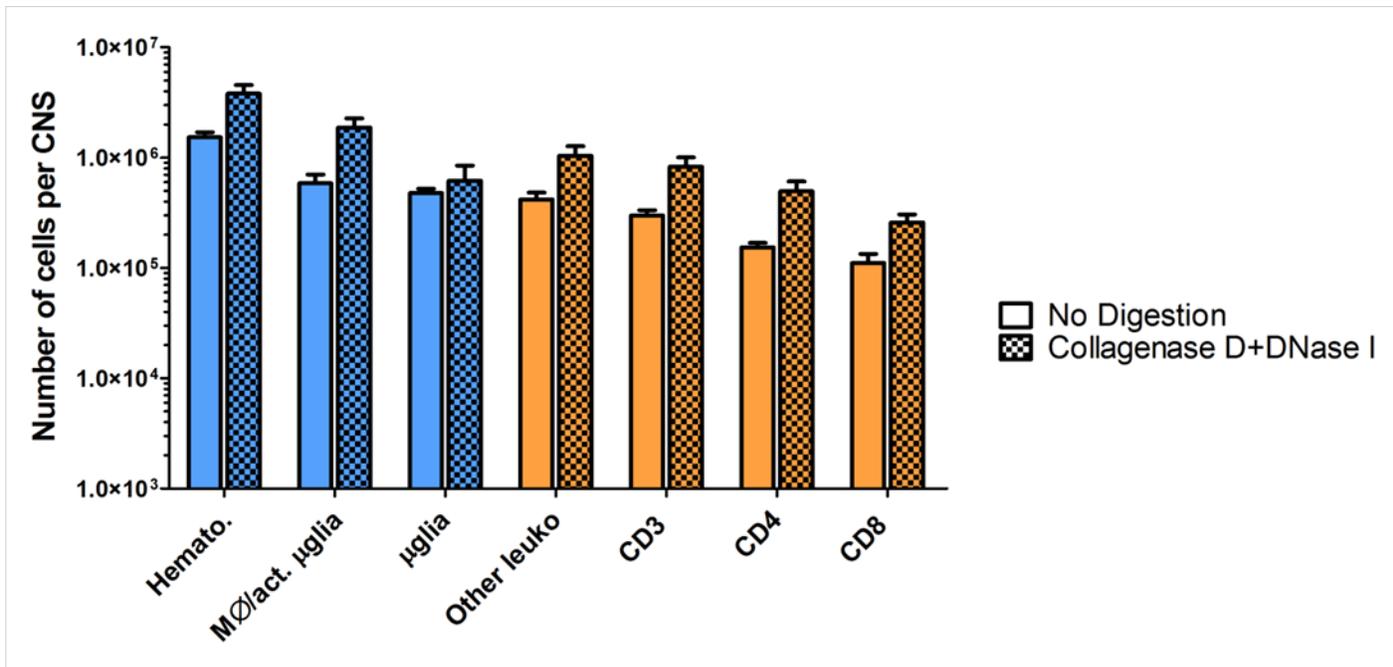
A**B**

Figure 3: Collagenase D+DNase I digestion improves the recovery of hematopoietic cells.

CNS (brain and spinal cord) tissues from individual EAE mice were either undigested (no digestion) or digested with collagenase D+DNase I. EAE mice were sacrificed on D13 after EAE induction and had equivalent clinical score (3.0-3.5). Cells were subsequently isolated using the one step Percoll™ method and stained for CD45, CD11b, CD3, CD4 and CD8. The number of cells was calculated and normalized using beads. A) Representative dot plots show the typical

gating for hematopoietic cells: microglia, activated microglia-macrophages in blue and non-myeloid (CD45^{high} CD11b⁻) leukocytes in orange (first column of dot plots). CD45^{high}CD11b⁻ cells were analyzed for the expression of CD3 (second column of dot plots) and CD3⁺ cells were further analyzed for CD4 and CD8 (last column). B) The number of cells per CNS sample recovered from each technique is illustrated as mean \pm SEM for 4 individual mice per group. The number of hematopoietic cells as well as the number of specific immune cell subsets recovered from the collagenase D+Dnase I samples were significantly greater than the number of cells obtained from the undigested samples. * $p < 0.05$. Hemato: hematopoietic cells; μ glia: microglia cells; M \emptyset /act. μ glia: macrophages/activated microglia cells; Other leuko: leukocytes other than microglia and macrophages.

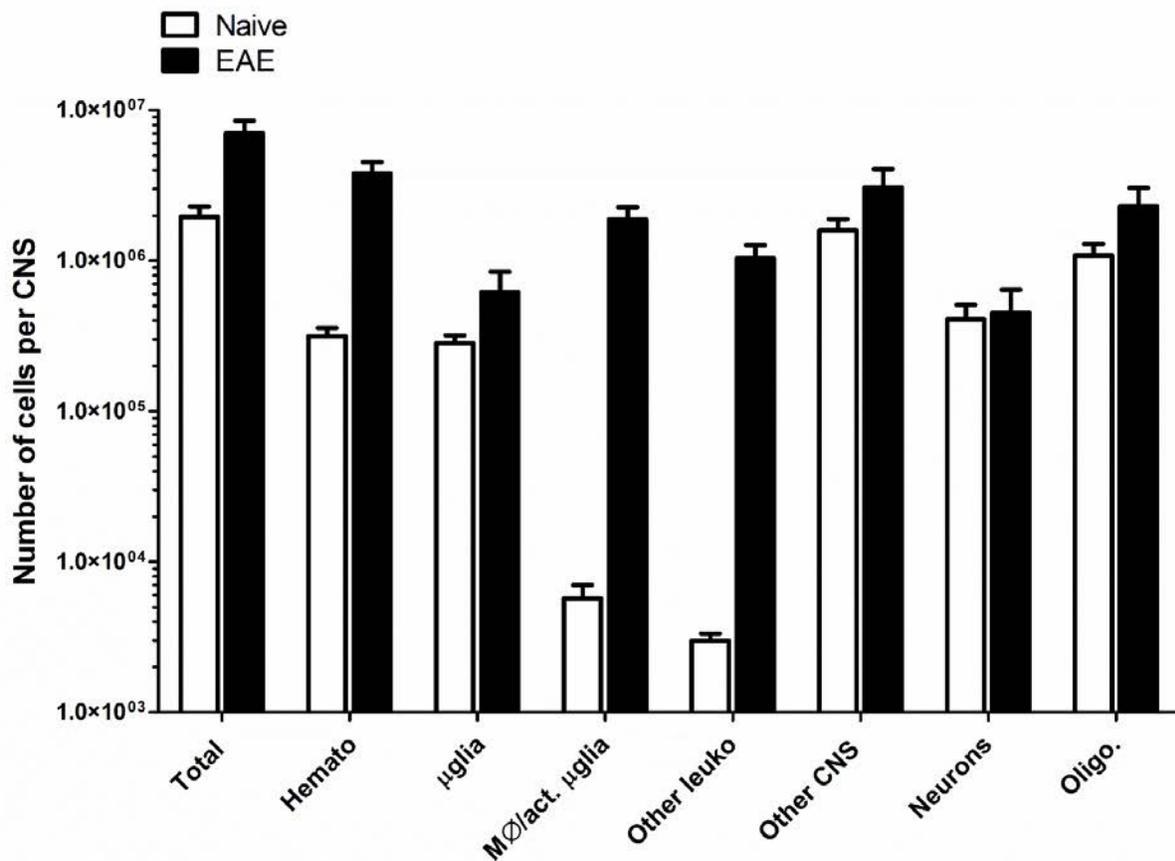


Figure 4: More leukocytes are isolated from the CNS of EAE mice compared to naïve animals.

CNS (brain and spinal cord) tissues from naïve or EAE mice were digested with collagenase D+DNase I. Cells were subsequently isolated using the one step Percoll™ method and stained for

CD45, CD11b, O4, NeuN, CD3, CD4 and CD8. The number of cells was calculated and normalized using beads. Data are presented as mean \pm SEM for 4 individual mice per group. The number of total cells, hematopoietic cells, macrophages and activated microglia and other leukocytes was significantly increased in EAE mice compared to naïve mice. Similar numbers of microglia, neurons and oligodendrocytes were isolated from naïve and EAE mice. Total: total cells; Hemato: hematopoietic cells; μ glia: microglia cells; M \emptyset /act. μ glia: macrophages/activated microglia cells; Other leuko: other leukocytes than microglia and macrophages; Oligo: oligodendrocytes.*** p<0.001, ** p<0.01

Article 2

NKG2D and its ligand MULT1 contribute to disease progression in a mouse model of multiple sclerosis

Front. Immunol., 06 February 2019 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.00154>

Laurine Legroux¹, Ana Carmena Moratalla¹, Cyril Laurent¹, Gabrielle Deblois¹, Sandrine Verstraeten², and Nathalie Arbour¹

¹ Department of Neurosciences Université de Montréal, CRCHUM 900 Saint-Denis Street, Montreal, QC, Canada

² Current address: Louvain Drug Research Institute, Cellular and Molecular Pharmacology Brussels, Belgium

Keywords:

T lymphocytes, central nervous system, autoimmune disease, neuroinflammation, NK Cell lectin-like Receptor Subfamily.

RÉSUMÉ

NKG2D est un récepteur activateur exprimé à la surface de cellules immunitaires comprenant des sous-groupes de lymphocytes T. NKG2D se lie à divers ligands (NKG2DL), l'induction de leur expression est différente suivant le type de cellule et de stress. L'interaction NKG2D-NKG2DL est impliquée dans les maladies auto-immunes, mais son rôle dans les modèles animaux de la sclérose en plaques (SEP) reste incomplètement résolu. Nous montrons ici que NKG2D et son ligand MULT1 contribuent à la pathobiologie de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE). Les taux de protéine MULT1 sont augmentés dans le système nerveux central (SNC) au pic de la maladie EAE ; MULT1 soluble est élevé dans le liquide céphalo-rachidien de l'EAE active et passive. Nous avons établi que MULT1 solubles améliorent les fonctions effectrices (par exemple la production d'IFN γ) des lymphocytes T CD8 activés provenant des souris sauvages mais non de souris déficientes pour NKG2D (*Klrk1*^{-/-}) in vitro. Le transfert adoptif de lymphocytes T activés provenant de donneurs de souris sauvages induit une maladie d'EAE significativement atténuée chez les receveurs *Klrk1*^{-/-} par rapport aux receveurs sauvages (*Klrk1*^{+/+}). La caractérisation des lymphocytes T infiltrant le système nerveux central (SNC) des souris receveuses montre que les lymphocytes T CD4 donneurs (CD45.1) et non les endogènes (CD45.2) sont les principaux producteurs de cytokines clés (IFN γ , GM-CSF). En revanche, les lymphocytes T CD8 infiltrants comprennent principalement des cellules endogènes (CD45.2) présentant des propriétés effectrices (NKG2D, granzyme B et IFN γ). Nos données appuient l'idée que les cellules T CD8 endogènes contribuent à la pathobiologie de l'EAE passive d'une manière dépendante de NKG2D. Collectivement, nos résultats soulignent le rôle délétère de NKG2D et de son MULT1 dans la pathobiologie d'un modèle de souris de la SEP.

SUMMARY

NKG2D is an activating receptor expressed on the surface of immune cells including subsets of T lymphocytes. NKG2D binds multiple ligands (NKG2DL) whose expression are differentially triggered in a cell type and stress specific manner. The NKG2D-NKG2DL interaction has been involved in autoimmune disorders but its role in animal models of multiple sclerosis (MS) remains incompletely resolved. Here we show that NKG2D and its ligand MULT1 contribute to the pathobiology of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). MULT1 protein levels are increased in the central nervous system (CNS) at EAE disease peak ; soluble MULT1 is elevated in the cerebrospinal fluid of both active and passive EAE. We establish that such soluble MULT1 enhances effector functions (e.g. IFN γ production) of activated CD8 T lymphocytes from wild type but not from NKG2D-deficient (*Klrk1*^{-/-}) mice *in vitro*. The adoptive transferred of activated T lymphocytes from wild type donors induced a significantly dampened EAE disease in *Klrk1*^{-/-} compared to wild type (*Klrk1*^{+/+}) recipients. Characterization of T lymphocytes infiltrating the central nervous system (CNS) of recipient mice shows that donor (CD45.1) rather than endogenous (CD45.2) CD4 T cells are the main producers of key cytokines (IFN γ , GM-CSF). In contrast, infiltrating CD8 T lymphocytes include mainly endogenous (CD45.2) cells exhibiting effector properties (NKG2D, granzyme B and IFN γ). Our data support the notion that endogenous CD8 T cells contribute to passive EAE pathobiology in a NKG2D-dependent manner. Collectively, our results point to the deleterious role of NKG2D and its MULT1 in the pathobiology of a MS mouse model.

APPORT DES AUTEURS AU MANUSCRIT

J'ai effectué la majorité des expériences et analyses permettant de faire les figures de ce papier. J'ai été aidé par Ana Carmena Moratalla et Cyril Laurent pour la gestion de la colonie déficiente pour NKG2D, les EAE passives et les expériences in vitro avec les protéines recombinantes ainsi que par Sandrine Verstraeten pour les RT-qPCR et Gabrielle Deblois pour les Western Blot avec RAE-1. J'ai rédigé la première version du manuscrit. La Dre Nathalie Arbour a entièrement relu, bonifié et corrigé le texte.

Introduction

Multiple sclerosis (MS) is an inflammatory disease of the central nervous system (CNS) characterized by demyelination, axonal loss, activation of glial cells, and infiltration of immune cells, such as macrophages and lymphocytes (1, 2). Although it is well established that the immune system participates in tissue destruction characteristic of MS, the contribution of specific immune mediators to the MS pathobiology has not been fully elucidated (2).

NKG2D is an activating or co-activating receptor expressed on several immune effector cells. Most human CD8 T lymphocytes and activated mouse CD8 T lymphocytes exhibit NKG2D on their surface as well as a small subpopulation of activated CD4 T lymphocytes in both species (3). NKG2D can recognize multiple ligands (NKG2DL); they include Rae-1 (a, b, g, δ and ϵ), H60 (a, b, c) and MULT1 in mice; whereas ULBP (1, 2, 3, 4, 5 and 6) and MIC (A and B) are the human NKG2DL (4). The expression of NKG2DL are regulated at multiple levels (transcription, post-transcription, post-translation, etc.) and vary according to cell type, activation and environmental cues (5-7). Although weakly expressed under normal physiological conditions, NKG2DL are strongly induced in response to stress such as inflammation or infection (4, 6).

Shedding of NKG2DL by tumor cells has been reported in both humans and mice (8). Specific soluble murine and human NKG2DL can trigger NKG2D internalization on effector immune cells and consequently contribute to tumor immune evasion (8). In contrast, soluble MULT1, the murine NKG2DL exhibiting the highest affinity for NKG2D (9), can augment NK cell activation and increase tumor rejection (10). Moreover, soluble MICA, a human NKG2DL, can enhance NK cell functions in vitro (11). Soluble NKG2DL have been detected in the serum of patients affected by autoimmune diseases including MS (12-15); it is not fully understood, however, if and how these molecules impact autoimmune pathological processes.

Several studies have suggested that NKG2D and its ligands play a role in the pathobiology of MS. We have previously shown that multiple NKG2DL are detectable at the protein level on human oligodendrocytes in primary cultures (16). We demonstrated that disruption of the

NKG2D-NKG2DL interaction inhibits killing of human oligodendrocytes mediated by activated human immune effectors including CD8 T lymphocytes (16). We detected oligodendrocytes expressing MICA/B in post-mortem MS tissues and CD8 T lymphocytes in close proximity to these MICA/B-expressing cells (16). Notably, Ruck and colleagues showed that CD4 T lymphocytes carrying NKG2D are enriched in the blood, cerebrospinal fluid and post-mortem brain lesions of MS patients compared to control donors especially during relapses (17). Whether NKG2D plays a role in MS pathobiology remains to be established.

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is the most commonly used rodent model to investigate this neuroinflammatory disease as it recapitulates multiple immunopathological features of MS (18). Studies by different groups support the notion that NKG2D participates in EAE immunopathobiology. The group of Raulet assessed the susceptibility of NKG2D-deficient (*Klrk1*^{-/-}) mice to active EAE induction. They observed that using a suboptimal dose of the encephalitogenic myelin peptide MOG35-55, disease was slightly reduced in *Klrk1*^{-/-} compared to wild type mice; such difference was not observed when optimal dose of MOG was injected (19). Wiendl's group showed that blocking NKG2D before, but not after, disease onset diminished active EAE disease severity and migration into the CNS of both CD4 and CD8 T lymphocytes (17). However, it remains unknown whether NKG2D acts via additional mechanisms in EAE pathobiology.

Here, we investigated the role of NKG2D and its ligands in the active and passive EAE models. We establish that one specific NKG2DL, MULT1, is significantly upregulated at the protein level in the spinal cord at the disease peak. Notably during EAE, the cleaved form of MULT1 is elevated not only in this organ but also in the cerebrospinal fluid. We show that soluble MULT1 increases the effector properties of CD8 T lymphocytes in vitro. Finally, we demonstrate using the adoptive model of EAE that endogenous T lymphocytes expressing NKG2D contribute to disease progression. Indeed, the adoptive transfer of wild type activated T lymphocytes triggers a significantly less severe disease and fewer CNS-infiltrated T lymphocytes in *Klrk1*^{-/-} compared to *Klrk1*^{+/+} recipients. Overall, our results suggest that NKG2D and its ligands play a role in the pathobiology of MS mouse model.

Materials and Methods

Animals

Wild type (WT) C57BL/6J (B6-CD45.2), B6.SJL-Ptprca Pepcb/BoyJ (B6-CD45.1), and *Klrk1*^{-/-} (B6.Cg-Klrk1tm1Dhr/J) mice were obtained from The Jackson Laboratory (Bar Harbor, ME, USA). All mice were treated in strict adherence with approved protocols (N13043NAs and N17031NAs) from the CRCHUM Institutional Committee for the Protection of Animals and the Canadian Council on Animal Care.

Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) disease induction and scoring

Active EAE was induced as previously published (20). Briefly, 6-8 week old female mice were immunized subcutaneously with 200 µg of myelin oligodendrocyte glycoprotein 35-55 (MOG35-55) peptide emulsified in Complete Freund's adjuvant supplemented with 400 µg of *Mycobacterium tuberculosis* (CFA-MOG35-55). Two days later, mice were intraperitoneally injected with 400 ng of pertussis toxin (PTX).

For passive EAE, 6-8 week old female donor WT mice were similarly immunized with CFA-MOG35-55 and injected intraperitoneally with 400 ng of PTX. Eight days later, donor mice were sacrificed; lymph nodes and spleens were harvested and processed as described below. Cells were put in culture at 7 million/ml in complete RPMI [10% (v/v) of fetal bovine serum, 50µM of β-mercaptoethanol, 1 mM of sodium pyruvate, 0.01 M of HEPES, 1X non-essential amino acids solution, 2 mM glutamine, 100 U/ml penicillin, and 100 µg/ml streptomycin] in the presence of MOG35-55 (20ug/ml), recombinant mouse IL-12 (10ng/ml, R&D Systems distributed by Cedarlane Laboratories Oakville, ON, Canada), recombinant human IL-2 (100 U/ml, Roche, Nutley, NJ) and mouse recombinant IL-15 (1ng/ml, R&D Systems) pre-complexed (incubation 30 min at 37°C) with recombinant mouse IL-15Ra (4.67ng/ml, R&D Systems) as published by others (21). After 72 hours of culture, cells were washed, resuspended in Hank's Balanced Salt solution, filtered on 70µm cell strainer, counted and injected intraperitoneally into naïve *Klrk1*^{-/-} and wild type (*Klrk1*^{+/+}) female mice.

Passive and active EAE animals were scored according to the following scale: 0=normal, 1=limp tail, 2= slow righting-reflex, 3=paralysis of one hind limb, 3.5=paralysis of one hind limb and weakness in second hind limb, 4= paralysis of both hind limbs, 4.5=paralysis of both hind limbs and weakness in forelimbs, 5=moribund. Deeply anesthetized mice were perfused with 50 ml of saline 0.9% (w/v) prior to collect organs for RNA extraction, protein extraction, or organ processing for flow cytometry analysis.

RNA extraction and RT-qPCR

Collected organs were put directly into TRIzol® Reagent (Life technologies Thermo Fisher Scientific, Burlington, ON, Canada). Total RNA was extracted from spleen, liver, spinal cord, brain stem-cerebellum and forebrain according to manufacturer's instructions. RNA samples were transcribed into cDNA using Quantitect Reverse transcription kit (Qiagen, Mississauga, ON, Canada) as previously published (22). Gene expression levels were determined by quantitative real-time PCR using primers and TaqMan FAM-labeled probes from Applied Biosystems-ThermoFisher Scientific and the QuantStudio 7 Flex Real-Time PCR System. Amplification of mouse HPRT1 (Mm01545399_m1) was used as an endogenous control to assess the expression of murine NKG2D ligands: MULT1 (Mm01180648_m1), panRAE (Mm00558293_g1), H60b (Mm04243254_m1) and H60c (Mm04243526_m1).

Protein extraction

Spinal cord, brain stem-cerebellum and forebrain were respectively homogenized in 500ul of lysis buffer [50mM Tris pH 7.5, 1mM EDTA, 150mM NaCl, 1% (w/v) NP40, 1% (w/v) SDS and cocktail of protease inhibitor containing 5µg/ml of: Leupeptin (BioShop, Burlington, ON, Canada), Pepstatin A (BioShop) and Chymostatin (Sigma-Aldrich, Oakville, ON, Canada)]. Lysates were kept 10 minutes at room temperature before storing at -80°C.

Cerebrospinal fluid (CSF) collection

Deeply anesthetized mice were placed on the stereotaxic instrument with 135o between head and body. Sagittal incision of the skin was made aligned with the ears, then the subcutaneous tissues and muscles were separated by blunt dissection and were hold by microretractor. The

capillary tube was introduced into the cisterna magna through the dura mater, laterally to the arteria dorsalis spinalis. CSF was harvested into capillary tube, collected into Eppendorf tube and immediately frozen on dry ice. Samples were stored at -80°C.

Western Blot

Proteins isolated from organs were electrophoresed under reducing conditions and transferred onto PVDF membrane as previously published (23). CSF samples were run on a stain free gel (Bio-Rad Laboratories, Mississauga, ON, Canada) containing trihalo compounds reacting with tryptophan residues and used to reveal total proteins on gel before transfer. MULT1 (rat monoclonal antibody clone 1D6 provided by Dr S. Jonjic, University of Rijeka, Rijeka, Croatia) and Rae-1 (polyclonal goat anti-Rae-1 pan specific R & D Systems), were quantified by chemiluminescence relative to total protein as published (24), actin (monoclonal antibody clone C4, MP Biomedicals, Fisher Scientific) or albumin (rabbit anti-albumin, Novus Biologicals, distributed by Cedarlane Laboratories) using the Chemidoc MP imaging system (Bio-Rad Laboratories).

Immune cell isolation from CNS and lymphoid organs

Brain and spinal cord were processed from individual mice as previously published (20). Briefly, minced CNS was digested 15 minutes with collagenase D and DNase I at 37°C prior to being mashed. Myelin was removed using Percoll. Harvested spleens and lymph nodes were put in complete RPMI and then mashed through cell strainer (70µm) to obtain single cell suspension. Red blood cells from spleens were lysed using 0.83% (w/v) of ammonium chloride for 4 minutes at room temperature.

Culture of splenocytes

Splenocytes from Klrk1^{+/+} or Klrk1^{-/-} mice were put in culture in complete RPMI in 48 well plates pre-coated with anti-CD3 antibody (2µg/ml in 100 mM NaHCO₃ overnight at 4°C, BD Biosciences, Mississauga, ON, Canada), anti-CD28 antibody (1µg/ml BD Biosciences), recombinant human IL-2 (100U/ml), and the complex recombinant mouse IL-15/IL-15Ra (described above). On day 5, recombinant murine MULT1 protein (10µg/ml, R&D Systems)

was added or not to splenocytes. On day 7, cells were activated for the detection of intracellular mediators and analyzed by flow cytometry as described below.

Flow cytometry

Flow cytometry staining was performed as previously published (22, 25, 26). Briefly, cells were incubated 15 min in blocking solution containing normal mouse immunoglobulins and rat anti-mouse CD16/CD32 prior to be incubated in the presence of fluorochrome-conjugated antibodies. Antibodies targeted CD45.1 (Biolegend, San Diego, CA, USA, clone A20), CD45.2 (BioLegend, distributed by Cedarlane Laboratories, clone 104), CD11b (BD Biosciences, clone M1/70), CD3 (BD Biosciences, clone 145-2C11), CD4 (BD Biosciences, clone RM4-5), CD8 (BD Biosciences, clone 53-6.7), and NKG2D (eBioscience or R&D systems, respectively clone CX5 or 191004). LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain was used to exclude dead cells. For cytokine detection, cells were stimulated 5 h with phorbol 12-myristate 13-acetate (20 ng/ml, Sigma-Aldrich) and ionomycin (1 ug/ml, Sigma-Aldrich) in the presence of brefeldin A (5 ug/ml, Sigma-Aldrich) and monensin sodium (1 μ M Sigma-Aldrich). Intracellular staining was accomplished as previously published (25). Antibodies targeted interferon-g (IFNg, BD Biosciences clone MP6-XT22), granulocyte-macrophage colony-stimulating factor (GM-CSF, BD Biosciences, clone MP1-22E9), interleukin-17 (IL-17, BD Biosciences, clone TC11-18H10) and granzyme B (eBioscience ThermoFisher Scientific, clone 16G6). Appropriate isotype controls were used in all steps. Staining specificity was confirmed using fluorescence minus one (FMO: all antibodies minus one). The median fluorescence intensity (MFI) was calculated by subtracting the fluorescence of the isotype from that of the stain. Cell numbers were quantified using either cell counting prior to cytometry staining or beads added to samples prior to sample acquisition as previously described (20).

Immunohistochemistry

Deeply anesthetized mice were perfused with 30 ml of saline 0.9% (w/v) and then with 50 ml of paraformaldehyde 4% (w/v in PBS). Spinal cord was collected and soaked into 4% paraformaldehyde for one day prior to being transferred into sucrose 30% (w/v) for 2 days and

then put into OCT for freezing at -80°C. Nine micron sections were stained for FluoroMyelin™ Green fluorescent myelin stain (ThermoFisher Scientific) and 2-(4-Amidinophenyl)-6-indolecarbamidine dihydrochloride, 4',6-Diamidino-2-phenylindole dihydrochloride (DAPI) (Sigma-Aldrich) for nucleus detection according to manufacturers' instructions. Slides were observed using a SP5 Leica confocal microscope and confocal images acquired sequentially in different channels using LASAF software and overlay using Adobe Photoshop software.

Statistical analysis

Data analysis was performed using Prism 7.0 software (GraphPad, La Jolla, CA, USA). Statistical tests used are indicated in figure legends. Values were considered statistically significant when probability (P) values were equal or below 0.05 (*), 0.01 (**), or 0.001 (***).

Results

NKG2D has a modest impact on active EAE

To assess the impact of NKG2D on the development of EAE, we applied our standard protocol on mice lacking NKG2D (Klrk1^{-/-}) and wild type (Klrk1^{+/+}) counterparts. We observed a modest and transient (day 11 to 14) enhanced peak of disease in Klrk1^{-/-} compared to wild type mice when large groups of animals were analyzed (n=22-25) (Figure 1A). We observed similar proportions of infiltrating CD4 (67-72% of total CD3 T lymphocytes) and CD8 (14-17% of total CD3 T lymphocytes) T cells in the CNS of both groups (Figure 1B, C). Within these CNS-infiltrated T lymphocytes, only a very small proportion of CD4 T lymphocytes expressed NKG2D (less than 8%) whereas 28% of CD8 T lymphocytes carried detectable levels of this receptor in Klrk1^{+/+} mice (Figure 1D). As expected, a negligible proportion of T lymphocytes expressed NKG2D in the Klrk1^{-/-} mice (Figure 1B, D). The total number of T cells, CD4 and CD8 T cells that infiltrated the CNS during EAE were similar in both genotypes (Figure 1E). Similar to what others published (19), NKG2D had a minimal impact on the neurobehavioral score of EAE mice. Our results show that during EAE, amongst the CNS-infiltrated T lymphocytes, a greater proportion of CD8 than CD4 T lymphocytes carried NKG2D but as CD4 T cells were more abundant, NKG2D-expressing CD4 and CD8 T lymphocytes were present in similar number per CNS in wild type mice (Figure 1E).

EAE induction modestly alters the expression of Rae-1 and H60 ligands

As each NKG2DL can be induced in response to different triggers and exhibits distinct biological functions, we assessed the expression of the specific ligands (H60 (b-c), Rae1 (a-e) and MULT1) known to be transcribed in C57BL/6 mice (9, 27-29), during the development of EAE. To investigate whether the presence of NKG2D-expressing immune effectors affects the ligands' expression, we quantified the relative mRNA levels of NKG2DL in Klrk1^{-/-} and wild type (Klrk1^{+/+}) mice at the different EAE stages: pre-symptomatic, onset and peak stages. We analyzed three CNS areas: spinal cord, brain stem/cerebellum and forebrain and observed that the mRNA levels of H60b did not significantly vary in the wild type mice (Figure 2A). We detected a slight but significant decrease in the spinal cord of Klrk1^{-/-} mice compared to

controls at disease onset and a slight increase in the brainstem-cerebellum (Figure 2A). H60c mRNA was not detected in all tested organs (CNS, spleen, etc.) except the eye (data not shown). Using a pan-Rae-1 qRT-PCR assay to detect all forms of Rae-1, we observed a small but significant increase at the peak of disease in wild type mice in the spinal cord compared to controls as previously reported by others (30). However, Rae-1 mRNA levels were decreased in the spinal cord of *Klrk1*^{-/-} mice at the presymptomatic and onset stages as well as in the forebrain at the presymptomatic stage (Figure 2A). Notably, the levels in *Klrk1*^{-/-} mice were significantly lower than in *Klrk1*^{+/+} at the same disease stage for the presymptomatic and onset in the spinal cord and the brainstem-cerebellum (Figure 2A). We also assessed the protein expression of Rae-1 in these CNS areas during the development of EAE. The relative amounts of Rae-1 did not vary between control mice (CFA without MOG) and EAE animals in all three CNS areas tested (spinal cord, brainstem/cerebellum, forebrain) (Figure 2 B-C).

Enhanced expression of MULT1 in the CNS of EAE mice

In contrast, MULT1 mRNA levels were significantly enhanced in the spinal cord of both *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} groups at the peak of EAE compared to controls, presymptomatic and onset time points (Figure 3A). Upregulated MULT1 mRNA levels during EAE were previously reported by others (30). Moreover, MULT1 mRNA levels were greater in *Klrk1*^{-/-} mice compared to wild type counterparts (Figure 3A) without reaching statistical significance. These observations suggest that in the presence of NKG2D-expressing immune effectors, MULT1-expressing cells may down-regulate such expression or may be destroyed. In the brainstem-cerebellum and forebrain, we also detected significantly augmented MULT1 mRNA levels at the peak of EAE compared with other disease stages in both *Klrk1*^{+/+} or *Klrk1*^{-/-} mice (Figure 3A). We observed a small increase of MULT1 mRNA levels in the spleen of *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} mice at disease peak and no variation in the liver (Figure 3B). These results demonstrate that during active EAE, MULT1 expression is significantly upregulated (over 900% increase in spinal cord) in the CNS.

To determine whether MULT1 expression is also increased at the protein level, we performed western blot analysis on the same CNS areas. We observed two bands representing the full length (50-55kDa) and the putative cleaved extracellular domain (25kDa) of MULT1 at the

peak of disease, which was absent in controls mice (Figure 3C). The quantification of MULT1 relative to actin showed that the spinal cord contained greater levels of both MULT1 forms (55 and 25 kDa) compared to brainstem/cerebellum and forebrain areas in *Klrk1*^{+/+} as well as *Klrk1*^{-/-} mice at disease peak (Figure 3D). The full and cleaved forms of MULT1 were detected in the spinal cord at the onset of EAE only in a subset of mice (4 out of 12 mice). Notably, greater amounts of the 25kDa band relative to the 55kDa band at disease peak were observed in both *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} mice (Figure 3 E-F). Our results strongly suggest that MULT1 is the NKG2DL with the greatest enhanced mRNA and protein expression levels at the peak of EAE in the CNS, especially in the spinal cord, regardless of the presence of NKG2D-expressing immune cells.

Elevated expression of soluble MULT1 in the CSF of EAE mice

To establish whether soluble MULT1 diffuses in the CNS, we performed western blots on CSF collected from control or EAE mice at different stages (pre-symptomatic, onset, peak) in *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} mice (Figure 4A). We observed that both forms (25 and 55 kDa) of MULT1 were detectable in the CSF and those levels were greater at disease peak compared to other EAE stages (Figure 4B). Notably, the 25kDa form was 7-fold more abundant than the 55 kDa form in the CSF (Figure 4C) compared to 4.5-fold increased expression in the spinal cord protein homogenates at the same disease stage (Figure 3F).

Soluble MULT1 released during EAE enhances T cell responses

We next sought to determine whether soluble MULT1 could impact activated T lymphocytes, which are abundantly present in the CNS of EAE mice. Splenocytes from naïve *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} mice were activated *in vitro* with anti-CD3+anti-CD28+IL-2+IL-15 to enhance NKG2D expression on CD8 T lymphocytes to similar levels observed on CNS-infiltrating CD8 T cells. After five days, recombinant mouse MULT1 or PBS was added to these activated cultures and two days later, cells were evaluated for their production of mediators by flow cytometry. Recombinant MULT1 was obtained from the same commercial source than what has been used by the Raulet's group to perform *in vitro* experiments with activated murine immune cells (10). Our *in vitro* culture conditions gave rise to a similar proportion

(37%) of activated *Klrk1*^{+/+} CD8 T lymphocytes expressing NKG2D (Figure 5A, B) as we observed on CNS-infiltrating CD8 T lymphocytes in EAE mice (Figure 1C, 28%). As expected, NKG2D expression was negligible on *Klrk1*^{-/-} cells. Notably, the addition of soluble MULT1 did not alter the percentage of cells expressing NKG2D; but slightly reduced NKG2D expression levels per cell in *Klrk1*^{+/+} CD8 T cells (Figure 5C; MFI for NKG2D on *Klrk1*^{+/+} CD8 T cells exposed to PBS (1279) vs. MULT1 (1068)). The addition of MULT1 increased the percentage of granzyme B-expressing CD8 T lymphocytes (Figure 5B; % granzyme-expressing *Klrk1*^{+/+} CD8 T cells exposed to PBS (44%) vs. MULT1 (67%) $p=0.09$); these cells expressed greater levels of this lytic enzyme compared to cells not treated with MULT1 (Figure 5C; granzyme B-MFI in *Klrk1*^{+/+} CD8 T cells exposed to PBS (3094) vs. MULT1 (4854) $p=0.1$). MULT1 did not alter the percentage of IFN γ producing *Klrk1*^{+/+} CD8 T lymphocytes (80-86%) but significantly increased their cellular expression level (Figure 5A, C; IFN γ -MFI on *Klrk1*^{+/+} CD8 T cells exposed to PBS (3095) vs. MULT1 (4901) $*p=0.0133$). The enhancing impact of MULT1 on CD8 T cell effector functions was dependent on the presence of NKG2D as this soluble ligand did not alter the production of granzyme B or IFN γ by *Klrk1*^{-/-} CD8 T lymphocytes as similar percentage of cells and MFI were observed for these cells in the PBS and MULT1 conditions (Figure 5). Our results suggest a novel activating role of soluble MULT1 on CD8 T lymphocytes.

NKG2D significantly augments passive EAE severity

Active EAE is strongly mediated by CD4 T lymphocytes but only a small proportion of these lymphocytes can express NKG2D upon activation. In contrast, a great proportion of activated murine CD8 T cells acquire NKG2D. To investigate the contribution of this receptor, we optimized a passive EAE model in which the transferred T cells include a similar proportion of CD8 and CD4 T cells. Lymphocytes from MOG-immunized donor mice were activated *in vitro* in the presence of IL-2, IL-12 and IL-15 prior to their transfer into naïve recipients. The addition of this cytokine cocktail led to the expansion of similar proportions of CD4 and CD8 T cells (data not shown). Activated cells were transferred into naïve *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} mice and clinical score recorded for 2 months (Figure 6A). Disease onset occurred similarly around day 10 post-transfer in both mouse groups (Figure 6A). However, *Klrk1*^{+/+} recipients

achieved a significantly more elevated clinical score than the *Klrk1*^{-/-} recipients (Figure 6A). The dampened disease in *Klrk1*^{-/-} recipients was maintained for the whole observation window. As these mice were injected in parallel with the same activated lymphocytes, the differences we observed could not be due to the transferred cells. Our results suggest that in passive EAE, endogenous immune cells contribute to disease pathobiology and that such impact depends on the endogenous expression of NKG2D.

We evaluated whether the injected cells contain MOG-specific T cells. The *in vitro* activation of lymph node cells isolated from MOG-immunized donor mice efficiently induced proliferation as assessed by CFSE dilution (Figure 6B). Moreover, the proportion of CD4 and CD8 T lymphocytes that divided during the *in vitro* expansion and could produce key immune effectors (GM-CSF, IFN γ , IL-17 or Granzyme B) was greater in the presence of MOG (Figure 6B). These results support the idea that at least a subset of transferred T lymphocytes were MOG-specific. In addition, the passive transfer of MOG-activated lymphocytes caused demyelination in recipient mice. Indeed, fluoromyelin staining revealed zones of demyelination (white arrows Fig. 6C) in both *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} mice. Finally, we also detected soluble MULT1 in the CSF of passive EAE mice supporting the notion that this NKG2DL is also elevated in this form of disease (Fig. 6D). Notably, the relative amount of the 25kDa form of MULT1 was significantly more elevated in CSF from *Klrk1*^{+/+} compared to *Klrk1*^{-/-} (Fig. 6D).

CNS-infiltrated endogenous CD8 T cells exhibit effector functions

To investigate the contribution of endogenous versus transferred T cells, we used C57BL/6 mice expressing the pan leukocyte marker CD45.1 as donor mice for the transfer into the CD45.2-expressing *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} recipients. Mice were sacrificed 25 days post-transfer and CNS cells were analyzed by flow cytometry. We could easily discriminate donor (CD45.1⁺) from recipient immune cells (CD45.2⁺) (Figure 7A). CD45^{int} CD11b⁺ microglia all expressed the endogenous CD45.2 allele (data not shown). We compared CD45.2^{hi}⁺ immune cells to the CD45.1⁺ cells in *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} recipients. Most transferred cells (CD45.1⁺) detected in the CNS were either CD4 or CD8 T cells (Figure 7B). Despite the injection of similar numbers of CD45.1⁺ CD4 and CD8 T cells, donor CD8 T cells

represented a very small proportion of CNS-infiltrated T cells, especially in *Klrk1*^{-/-} mice, while donor CD4 T cells were well represented. In contrast, amongst the endogenous immune cells present within the CNS, a greater proportion were CD8 T cells (41 % in *Klrk1*^{+/+} and 44% in *Klrk1*^{-/-}) compared to CD4 T cells (30.7% and 28.8%) (Figure 7B). The spleens of all animals contained very low proportion of CD45.1⁺ (donor) T cells (around 1%) suggesting that the transferred cells either died or migrated to other sites such as the CNS at the time point tested (over 20 days after transfer). Overall, less transferred T cells were detected in the CNS of *Klrk1*^{-/-} recipients than wild type counterparts correlating with the reduced disease severity in *Klrk1*^{-/-} recipients (Figure 7B).

To characterize the properties of CNS-infiltrated T cells, we assessed the production of key immune effector molecules: IFN γ , GM-CSF and granzyme B in CD45.1⁺ or CD45.1-negative (CD45.2⁺) CD4 and CD8 T cells in both *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} recipients. Production of IFN γ by CNS-infiltrated CD4 and CD8 T cells was easily detected in both mouse groups. Notably, a significantly lower proportion of endogenous (CD45.2) CD4 T cells produced this cytokine compared to the counterparts originating from the transfer (* $p < 0.05$) in *Klrk1*^{+/+} mice (Figure 7C). In contrast, the proportion of endogenous (CD45.2) CD8 T cells producing IFN γ was significantly higher than within transferred CD8 T cells (** $p < 0.01$; Figure 7D). A relatively small but similar proportion of endogenous and transferred CD4 T cells expressed granzyme B (Figure 7C). However, the percentage of CD8 T cells carrying this lytic enzyme was significantly greater in the endogenous cells than in the transferred one ($p < 0.05$, Figure 7D). We observed a significantly greater proportion of transferred (CD45.1) than endogenous (CD45.2) CD4 T cells producing GM-CSF (Figure 7C). Only few or no CD8 T cells produced GM-CSF or IL-17 above background level (data not shown). Notably, elevated proportions of endogenous CD4 and CD8 T cells in the CNS of *Klrk1*^{-/-} recipients produced the immune mediators tested (IFN γ , GM-CSF or granzyme B).

We also measured the expression of NKG2D and could observe that as expected none of the endogenous CD8 T cells carry this receptor in the *Klrk1*^{-/-} recipients. Nevertheless, a significantly higher percentage of endogenous (CD45.2) than transferred (CD45.1) CD8 T cells exhibited NKG2D in wild type recipients. It was not possible to compare transferred and

endogenous CD8 T cells in *Klrk1*^{-/-} recipients due to the absence or very low number of CD45.1⁺ CD8 T cells in these mice (Figure 7D). A very low percentage of CD4 T cells expressed NKG2D in our model precluding any comparison. Our results suggest that both endogenous and transferred CD8 T cells could recognize NKG2D ligands in the CNS during passive EAE.

To illustrate the striking differences within CNS-infiltrated T cells, we generated pie charts showing that amongst CD4 (Figure 7C) or CD8 (Figure 7D) T lymphocytes the proportions of cells with an endogenous (CD45.2) or transferred (CD45.1) origin. These representations underline that amongst all CNS-infiltrating CD4 T cells those producing IFN γ or GM-CSF originated mainly from the transferred cells (Figure 7C). The second and third column of pies also illustrate the greater proportion of transferred CD4 T cells (CD45.1) producing these cytokines. In contrast, in the CD8 T cell compartment, most cells expressing effector molecules (IFN γ , granzyme B or NKG2D) originated from the endogenous compartment (Figure 7D). In fact, as mentioned above, few transferred CD8 T cells (CD45.1⁺) reached the CNS although similar amount of these cells were co-transferred with CD4 T cells. Nevertheless, most CD45.1⁺CD8 T cells that reached the CNS were able to produce IFN γ and an important proportion expressed NKG2D (Figure 7D second

column of pies). Given that a greater proportion of CD8 T cells express NKG2D than CD4 T cells, our results identify CD8 T cells as potential players within the endogenous NKG2D⁺ immune cells contributing to disease severity in the adoptive model of EAE.

Discussion

In the present study, we establish a novel role for the NKG2D-NKG2DL interaction in the pathobiology of a mouse model of MS. We demonstrate that the activating receptor NKG2D contributes to the pathogenic properties of T lymphocytes that are recruited to the CNS upon peripheral activation of encephalitogenic T lymphocytes. We show that one particular murine NKG2DL, MULT1 is elevated in the target organ and enhances effector functions of activated CD8 T lymphocytes.

Although EAE models do not recapitulate the full complexity of MS pathobiology, they provide relevant *in vivo* models to investigate the contribution of immune factors to different disease stages such as initiation, progression or recovery (31). We investigated the role of NKG2D using these *in vivo* MS models. We induced active EAE in *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} mice from the same breeding colony and noted only a small difference in neurobehavioral scores (Figure 1A). Our results confirm that in the absence of NKG2D, active EAE develops with similar kinetics and amplitude than when this receptor is present. Indeed, Guerra and colleagues observed a slightly reduced EAE disease in *Klrk1*^{-/-} compared to wild type mice only when using a suboptimal dose of MOG35-55 (19). It is well established that active EAE is strongly driven by CD4 T lymphocytes. However, NKG2D is only expressed on a small proportion of activated CD4 T lymphocytes (<10% Figure 1C); thus, we can speculate that NKG2D does not alter the encephalitogenic potential of CD4 T lymphocytes in optimal active disease conditions. Ruck and colleagues showed that inhibiting NKG2D after immunization but prior to disease onset reduced disease; however, blocking NKG2D after disease onset had no impact on EAE (17). These authors provided data supporting the idea that blocking NKG2D reduced the migration of T lymphocytes into the CNS. Their results suggest that if NKG2D is blocked while CD4 T lymphocytes that have been activated in response to the immunization are traveling from the periphery to the CNS, it is possible to dampen their capacity to enter this organ. Blocking NKG2D prior to disease onset using soluble NKG2D was more efficient at reducing disease than an anti-NKG2D antibody (17). We can speculate that the soluble NKG2D, in contrast to the anti-NKG2D antibody, could bind to soluble forms

of NKG2DL and prevent their effects and accumulation. Overall, these experiments suggest that NKG2D plays a role in CD4 T cell driven active EAE model mainly at disease onset.

To investigate the contribution of NKG2D at the effector phase of EAE and in the absence of adjuvant, we use the passive EAE model. As a greater proportion of activated CD8 T lymphocytes express NKG2D compared to CD4 counterparts (Figure 1D), we optimized our culture conditions to transfer similar proportions of both CD4 and CD8 T cell subsets into naïve recipients. We ruled out any differences in activated wild type lymphocytes between groups and always injected *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} mice in parallel. Disease onset was similar in both groups; however, we reproducibly observed reduced disease severity in *Klrk1*^{-/-} recipients compared to *Klrk1*^{+/+} counterparts for the entire examination period (Figure 6A). Using CD45.1 and CD45.2 detection, we could easily discriminate endogenous leukocytes (CD45.2) from the transferred immune cells (CD45.1) (Figure 7). A greater proportion of CNS-infiltrated T cells originated from the transferred CD4 than CD8 T lymphocytes, regardless of their genotype (Figure 7B). In contrast, endogenous CD8 T lymphocytes were more abundant than the endogenous CD4 T lymphocytes (Figure 7B). This observation is relevant as multiple publications have documented that the number of CD8 T lymphocytes is equal or surpasses the number of CD4 T lymphocytes in MS lesions (32-36). Notably, transferred and endogenous T lymphocytes could produce immune mediators associated with effector functions (IFN γ , GM-CSF, Granzyme B) (Figure 7). Our results support the notion that endogenous immune cells contribute to the disease severity triggered by the transfer of MOG-activated T cells, via a NKG2D-dependent mechanism (Figure 6).

It is well established that the expression of each NKG2DL is regulated at multiple steps in a cell type specific manner (5-7). It is thus necessary to assess the presence of these ligands at the protein level. We established that one NKG2DL in particular, MULT1, was significantly elevated in the CNS at the peak of EAE in both *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} mice while other ligands (Rae-1 and H60) were modestly, or not, altered at the mRNA level (Figure 2A). In line with our results, others also reported elevated mRNA levels of MULT1 in the spinal cord during EAE (30), but they did not assess protein expression. We employed primers detecting all forms of Rae-1 and observed small variations for the expression of this group of NKG2DL

(Figure 2). Using specific primers for two Rae-1 family members, Rae1d and Rae1, Djelloul and colleagues observed elevated mRNA levels in lumbar spinal cord of C57BL/6 mice during EAE (30). Rae-1 was detected at low levels by Western blot in spinal cord of both PLP139-151 SJL/J and MOG35-55 C57BL/6 EAE mice (37). We detected Rae-1 family members using a pan-antibody by western blot in different CNS areas but did not observe variations between EAE mice and controls (Figure 2B-C). Overall, our data suggest that the protein expression of Rae-1 family members was not significantly modified in the CNS during EAE but we cannot rule out that the expression of specific Rae-1 members was impacted.

In contrast, we established that the protein expression of MULT1 is elevated in the spinal cord at the peak of active EAE disease. Notably, we detected two bands corresponding to the full length (50-55 kDa) and to the cleaved protein (25kDa) (Figure 3) especially in the spinal cord of EAE mice. The shed form of MULT1 was 4-5 times more abundant than the full length form in spinal cord lysates from EAE animals at the peak of disease (Figure 3). Moreover, we detected an elevated amount of the shed form of MULT1 in the CSF of EAE mice especially at disease peak (Figure 4). We observed similar levels of MULT1 in both *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} groups suggesting that the expression of MULT1 does not depend on the presence of NKG2D on immune cells. The soluble shed form of MULT1 was also detectable in the CSF of passive EAE mice (Figure 6) supporting the notion that neuroinflammatory responses triggered by T cells in the absence of adjuvant also caused MULT1 release in the CSF. Raulet's group detected soluble MULT1 in serum of MULT1⁺ tumor bearing mice and established that the 24 kDa form of MULT1 could be shed via matrix metalloproteinase dependent mechanisms (10). We can speculate that a similar mechanism takes place during EAE as multiple matrix metalloproteinases are elevated in the CNS of EAE mice as well as in the brain tissue, serum and CSF of MS patients (38, 39). Overall, our results show that protein levels of MULT1 are enhanced in the CNS during EAE and that this ligand is present in a shed form detectable in tissue and CSF.

Multiple lines of evidence have established that amongst all NKG2DL, MULT1 exhibits unique properties. MULT1 displays the highest affinity for NKG2D (9). Multiple groups have documented that in mice and humans, shed NKG2DL can act as decoy ligands by preventing

NKG2D-expressing immune effector cells from recognizing NKG2DL-bearing target cells, especially in the context of tumor evasion (40, 41). In contrast, the Raulet's group has elegantly shown that shed MULT1 enhances NK cell functions and consequently augments tumor rejection in mice (10). Therefore, we investigated whether soluble MULT1 could similarly enhance T cell functions. In contrast to NK cells, murine T cells do not express NKG2D unless they are activated. To mimic the *in vivo* EAE situation, we activated *in vitro* splenocytes from naïve *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} mice using conditions leading to similar proportion (28-35%) of CD8 T lymphocytes expressing NKG2D in wild type cells (Figure 5A). We added soluble recombinant MULT1, obtained from the same commercial source used by Raulet's group, to the activated splenocytes. We established that the addition of soluble MULT1 upregulated the proportion of CD8 T lymphocytes expressing granzyme B and the cellular expression levels of IFN γ (Figure 5). These boosting effects of soluble MULT1 were not observed in splenocytes from *Klrk1*^{-/-} mice confirming that these effects required NKG2D expression. Our results establish that soluble MULT1 enhances CD8 T cell effector functions via NKG2D. Overall, our *in vivo* and *in vitro* data support the notion that endogenous CD8 T cells contribute to passive EAE pathobiology in a NKG2D-dependent manner and these cells increase their effector functions in response to elevated levels of MULT1. Collectively, our results point to the deleterious role of NKG2D and its ligand MULT1 in the pathobiology of a MS mouse model.

The potential contribution of the NKG2D-NKG2DL interaction to the pathobiology of MS in patients is supported by several publications. Wiendl's group observed that CD4 T lymphocytes carrying NKG2D are enriched in the blood, CSF and post-mortem brain lesions of MS patients compared to control donors especially during relapses (17). Elevated levels of soluble MICB but not MICA have been reported in serum of MS patients compared to healthy donors and even more during relapse compared to remitting phase (15). We have previously shown that human oligodendrocytes both in primary cultures and in post-mortem MS brain tissues express at least one of the NKG2DL (MICA/B) (16). To develop an NKG2DL specific therapy, it will be relevant to investigate the presence of all NKG2DL in MS lesions but also their soluble forms in biological fluids such as CSF and serum. A clinical trial using an anti-NKG2D antagonist antibody in inflammatory bowel diseases has provided the proof of

concept that the NKG2D-NKG2DL interaction is a valid therapeutic target in human inflammatory diseases (42). Based on our results, we suggest that directing therapies at one specific NKG2DL instead of the receptor could potentially provide a more specific approach.

Acknowledgments

This study was supported by an operating grant from the Multiple Sclerosis Society of Canada (MSSOC). L.L. held a studentship from the MSSOC. A.C.M. obtained a joint studentship from the MSSOC and the Fonds de Recherche du Québec-Santé (FRQS). C.L. previously obtained a postdoctoral award from Fondation pour l'Aide à la Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP) (France) and the FRQS and currently holds a fellowship from the Canadian Institutes of Health Research. We acknowledge the technical assistance of Diane Beauseigle. We thank the animal facility, the flow cytometry core facility and the microscopy core facility of the CRCHUM as well as the laboratory members: Marie-Laure Clénet, Negar Farzam-kia, and Florent Lemaitre for their suggestions on the manuscript.

Author Contributions Statement

L.L., A.C.M., C. L., G. D. and S. V. conducted experimental work. N.A. designed the study. L.L., A.C.M. and N.A. analyzed and interpreted the data. N.A. wrote the manuscript and secured funding.

Conflict of Interest Statement

The authors disclose no conflict of interests.

Figure Legends

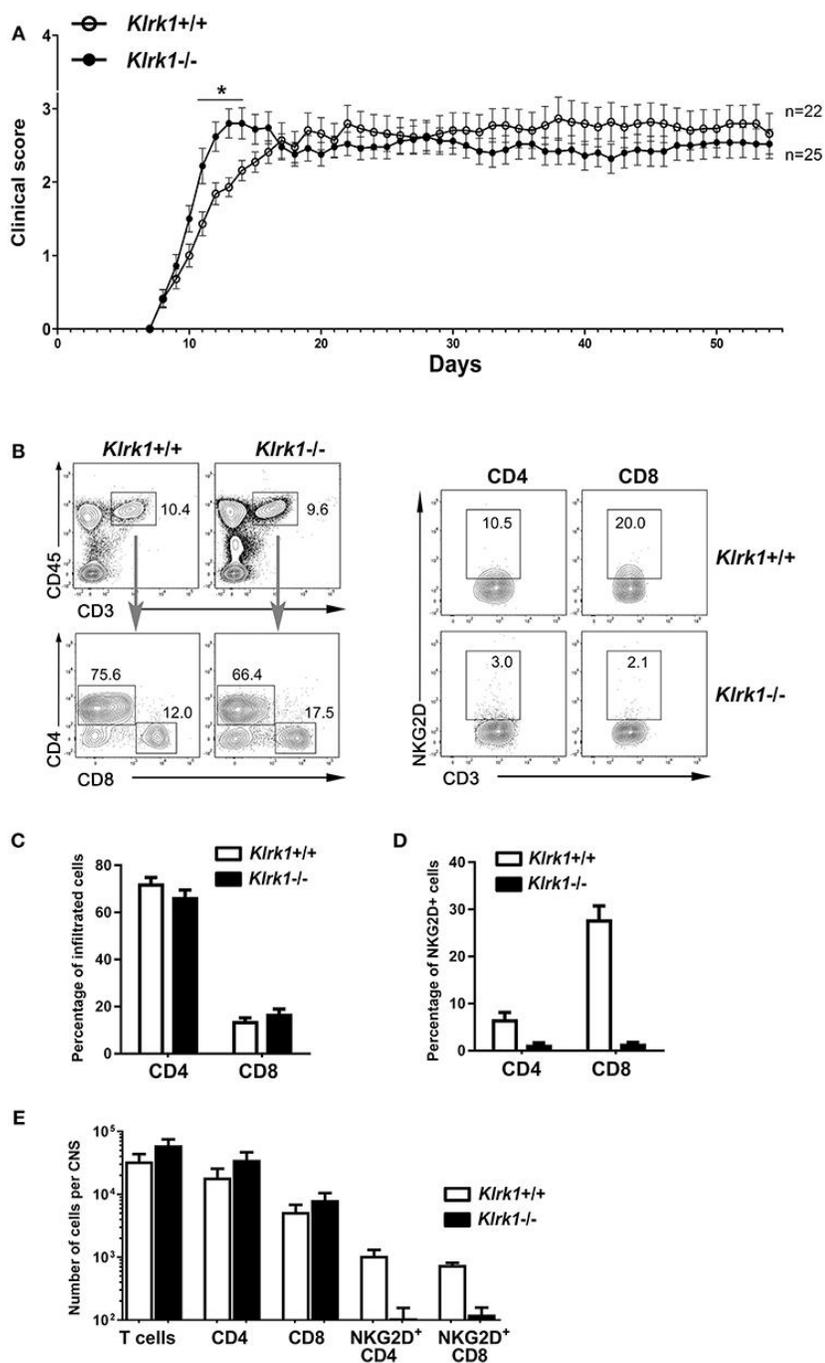


Figure 1: Active EAE disease course is similar in the absence of NKG2D

Active EAE was induced in *Klrk1*^{-/-} (black circles) and wild type (*Klrk1*^{+/+}, open circles) mice. Clinical score was assessed over 55 days or CNS infiltrating T lymphocytes

characterized by flow cytometry. A) Clinical score of *Klrk1*^{+/+} (n=22) and *Klrk1*^{-/-} mice (n=25) presented as mean + SEM. 2way ANOVA *Klrk1*^{-/-} vs. *Klrk1*^{+/+} day 11 to 14 * $p < 0.05$. B) Representative contour plots show gating for T cells (CD45^{hi}CD3⁺) and then CD4 and CD8 as well as the detection of NKG2D on CD4 and CD8 T cell subsets from CNS cells of *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} mice. C) Percentage of CNS infiltrated CD4 and CD8 T lymphocytes within CD3 T cells. Mean + SEM n=3. D) Percentage of CNS-infiltrated CD4 and CD8 T lymphocytes expressing NKG2D. Mean + SEM n=3. E) Number of cells per CNS (spinal cord and brain pooled from each individual mouse) for T cells (CD45^{hi}CD3⁺), CD4 and CD8 T cells as well as NKG2D⁺CD4 T cells and NKG2D⁺CD8 T cells. Mean + SEM n=3.

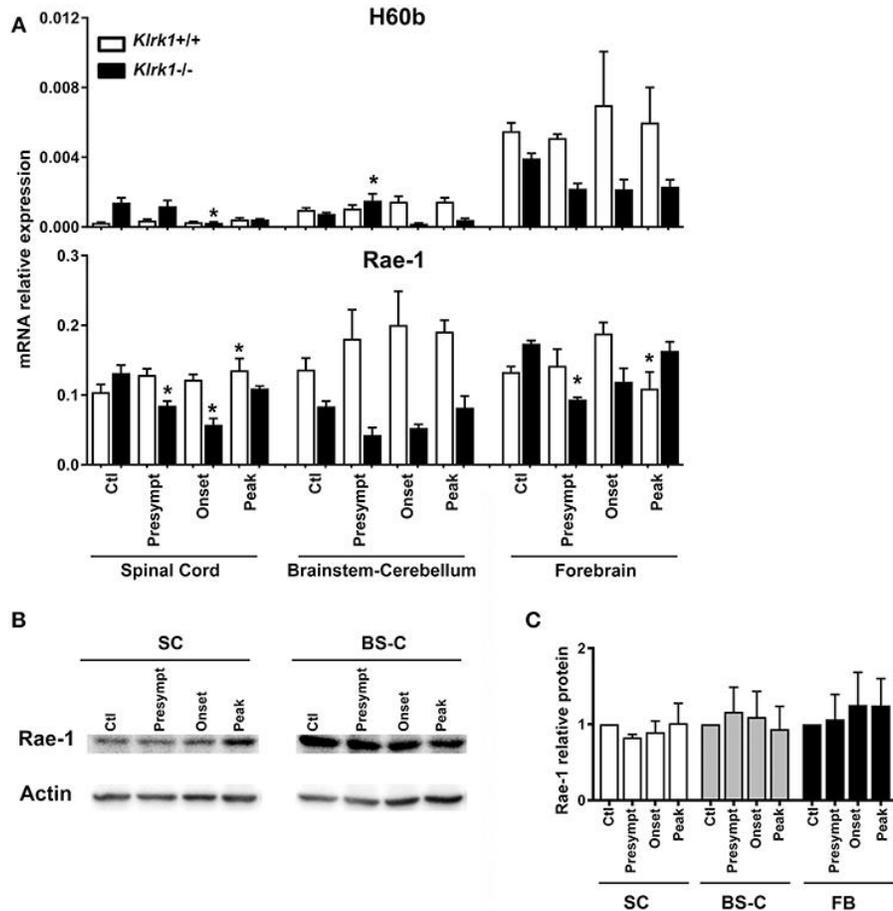


Figure 2: Variations in CNS expression of Rae-1 only at the mRNA level

A) Relative mRNA expression of H60b and Rae-1 in CNS areas [spinal cord (SC), brainstem-cerebellum (Bs-C) and forebrain (Fb)] from *Klrk1*^{-/-} (black bars) and wild type (*Klrk1*^{+/+}; white bars) mice either injected with CFA-PBS as control (Ctl) or subjected to active EAE and sacrificed at pre-symptomatic (presympt), onset or peak stage of disease. Kruskal-Wallis test and Dunn's test analysis within the same genotype group. Statistical differences for H60b in *Klrk1*^{-/-} group: spinal cord onset vs. control or presymptomatic; brainstem-cerebellum presymptomatic vs. onset or peak. Statistical differences for Rae-1 expression in *Klrk1*^{+/+} group: spinal cord: peak vs. ctl; forebrain onset vs. peak. Statistical differences for Rae-1 expression in *Klrk1*^{-/-} group: spinal cord control vs. presymptomatic or onset; for forebrain presymptomatic vs. control or peak. * $p < 0.05$. B-C) Western blot analysis of Rae-1 expression in the spinal cord (SC, brainstem-cerebellum (Bs-C) and forebrain (Fb) from wild type mice

(Klrk1^{+/+}) either injected with CFA-PBS as control (Ctl) or subjected to active EAE and sacrificed at pre-symptomatic (presympt), onset or peak stage of disease. B) One representative Western blot and C) Rae-1 relative expression to actin, ctl for each organ defined as 1. Mean + SEM n= 5.

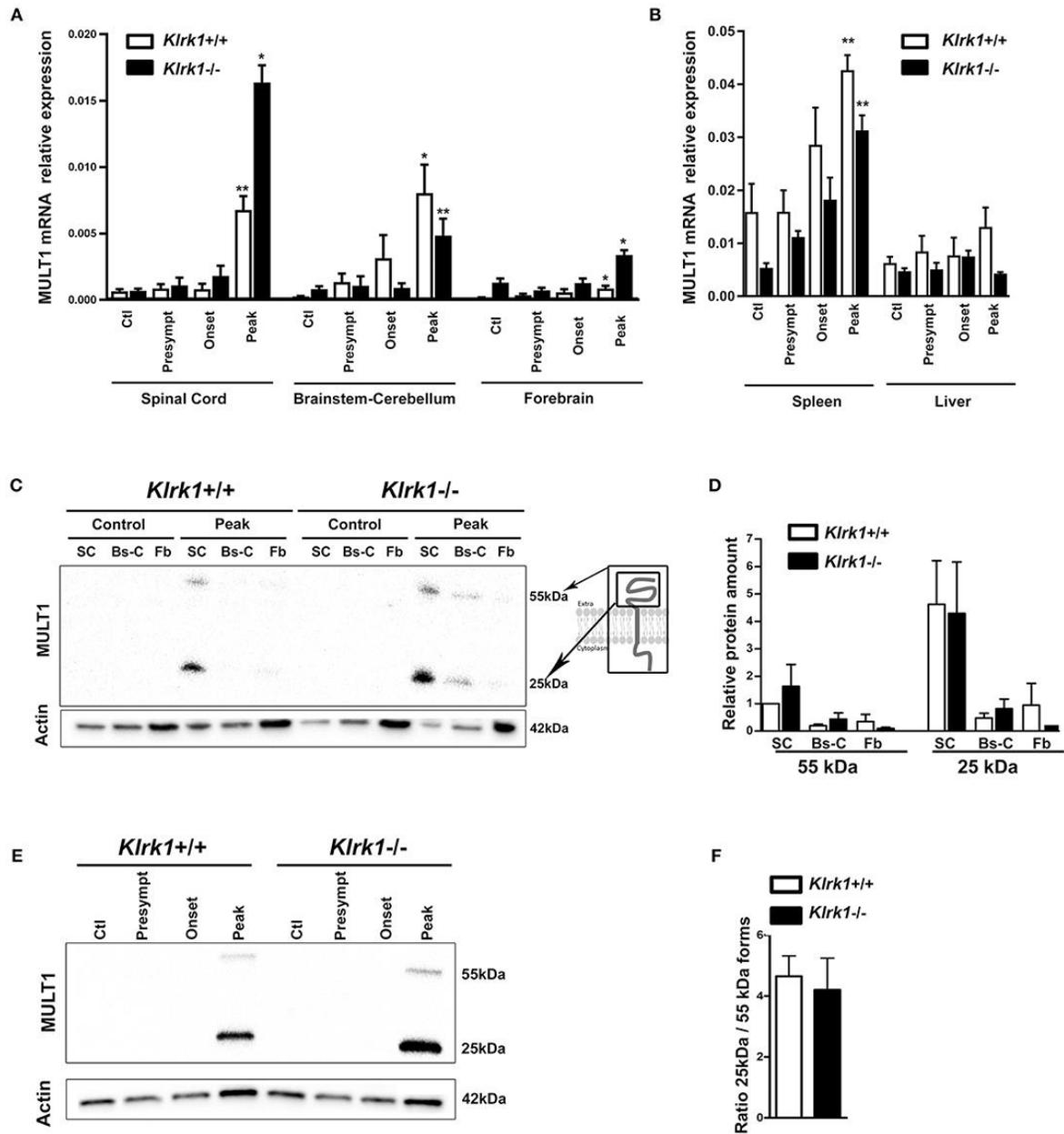


Figure 3: Upregulation of MULT1 at the mRNA and protein levels in the CNS during EAE

Quantification of MULT1 expression in organs from *Klrk1*^{-/-} (black bars) and wild type (*Klrk1*^{+/+}; white bars) mice either injected with CFA-PBS as control (Ctl) or subjected to active EAE and sacrificed at pre-symptomatic (presympt), onset or peak stage of disease. A) MULT1 relative mRNA expression in the spinal cord (SC), brainstem-cerebellum (Bs-C) and forebrain (Fb). Mean + SEM n= 4-8. Kruskal-Wallis test and Dunn's test analysis within the

same genotype group; statistical differences in *Klrk1*^{+/+} group: spinal cord and brainstem-cerebellum: peak vs. ctl, presympt, or onset; forebrain peak vs. control. Statistical differences within *Klrk1*^{-/-} group: spinal cord peak vs. control, presymptomatic or onset stage; brainstem-cerebellum peak vs. presymptomatic ; forebrain peak vs. presymptomatic. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. B) MULT1 relative mRNA expression in spleen and liver. Kruskal-Wallis test and Dunn's test analysis within the same genotype group; statistical differences in spleen for both *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} groups: peak vs. ctl. ** $p < 0.01$. C-F) Western blot analysis of MULT1 and actin levels in different CNS areas from *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} mice at different disease stages. C) One representative western blot of spinal cord (SC), brainstem-cerebellum (Bs-C) and forebrain (Fb) from control mice and mice at EAE peak; cartoon illustrating full and cleaved forms of MULT1. D) Quantification of 55kDa and 25kDa forms as relative expression compared to actin at disease peak in *Klrk1*^{-/-} (black bars) and *Klrk1*^{+/+} (white bars) mice; levels in *Klrk1*^{+/+} spinal cord at disease peak defined as 1. Mean + SEM n= 4-6. E) One representative western blot of spinal cord from *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} mice treated as control or EAE at different disease stages. F) Ratio of the 25kDa on 55 kDa forms in the spinal cord at peak of disease for both genotypes. *Klrk1*^{-/-} (black bars) and *Klrk1*^{+/+} (white bars). Mean + SEM n= 4-6.

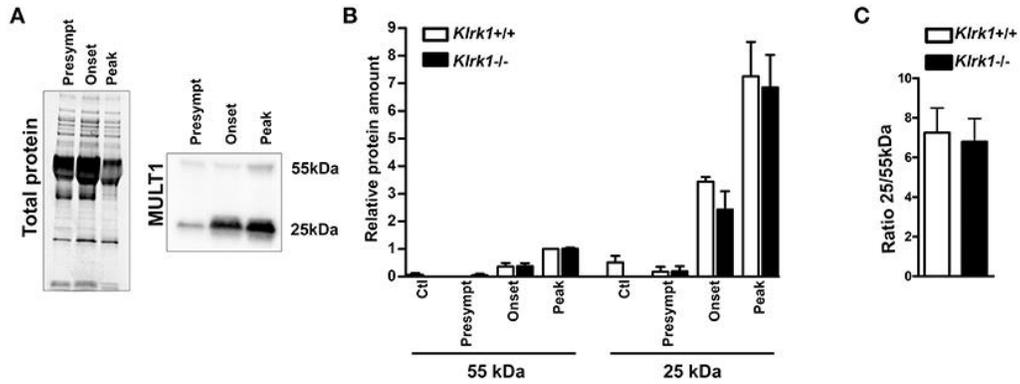


Figure 4: Increased levels of soluble MULT1 in the CSF during EAE

Quantification of soluble MULT1 in CSF from *Klrk1*^{-/-} (black bars) and wild type counterparts (*Klrk1*^{+/+}; white bars) either injected with CFA-PBS as control (Ctl) or subjected to active EAE and sacrificed at pre-symptomatic (presympt), onset or peak stage of the disease. A) One representative western blot for the detection of total protein and MULT1. B) Quantification of 55kDa and 25kDa forms as relative expression compared to total protein; levels in *Klrk1*^{+/+} at disease peak defined as 1. Mean + SEM n=3-4. C) Ratio of the 25kDa/55 kDa forms at disease peak. Mean + SEM n= 4.

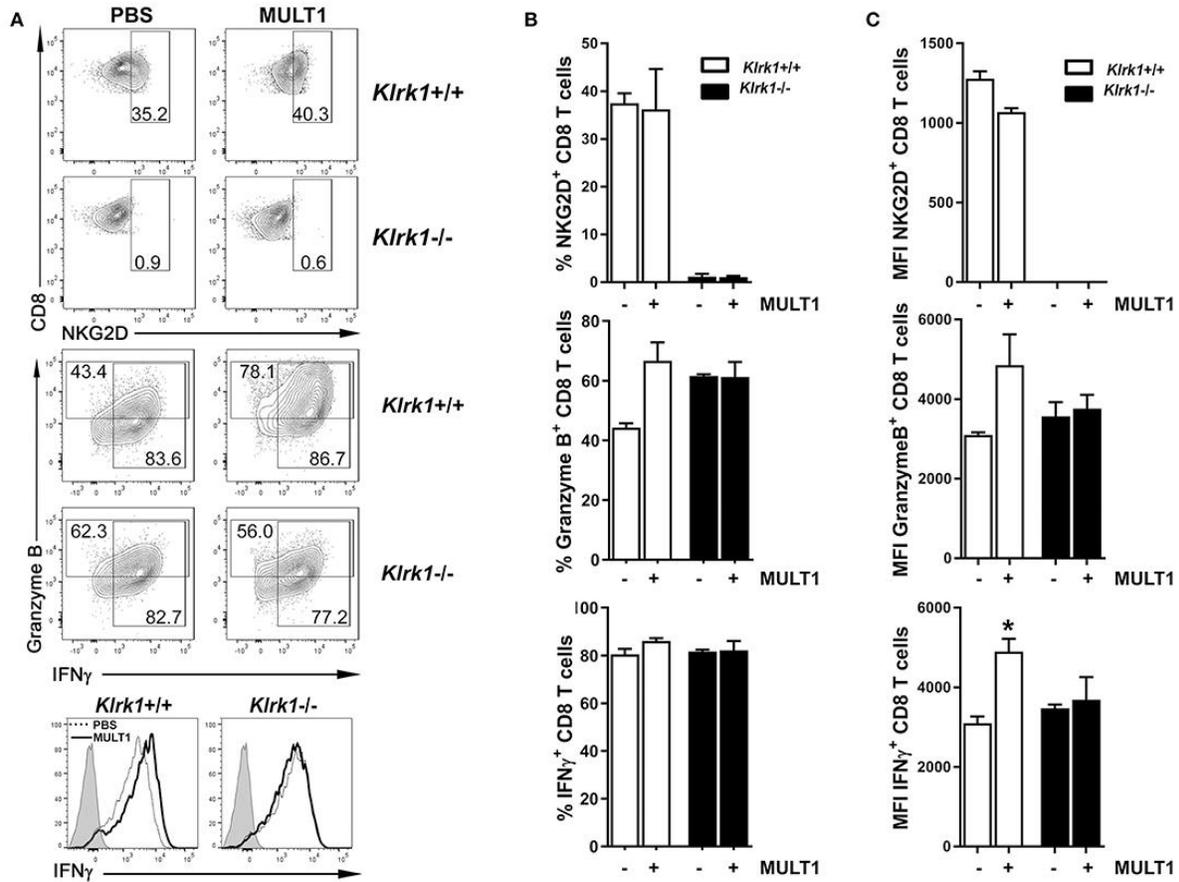


Figure 5: Soluble MULT1 augments effector functions of CD8 T lymphocytes

Splenocytes from naïve *Klrk1*^{-/-} (black bars) and wild type (*Klrk1*^{+/+} white bars) mice were activated with anti-CD3, anti-CD28, IL-2 and IL-15 for five days and then exposed or not to soluble recombinant MULT1 for an additional two day culture. Cells were subsequently shortly activated and analyzed by flow cytometry for the expression of CD3, CD8, NKG2D, granzyme B and IFN γ . A) Representative contour plots are illustrated for the detection of NKG2D or Granzyme B and IFN γ on CD3⁺CD8⁺ T cell-gated cells from *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} mice. Histograms showing IFN γ on CD3⁺CD8⁺ T cell-gated cells from *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} mice according to treatment: PBS (dotted line) or MULT1 (filled line); grey filled represents isotype control. B) Percentage of CD8 T lymphocytes expressing NKG2D, Granzyme B or IFN γ . Mean + SEM n=3 individual mice of one representative experiment. C) MFI intensity for CD8 T lymphocytes expressing NKG2D, Granzyme B or IFN γ . Mean +

SEM n=3 individual mice of one representative experiment. Statistical differences within Klrk1+/+ group without vs. with MULT1 * p<0.05.

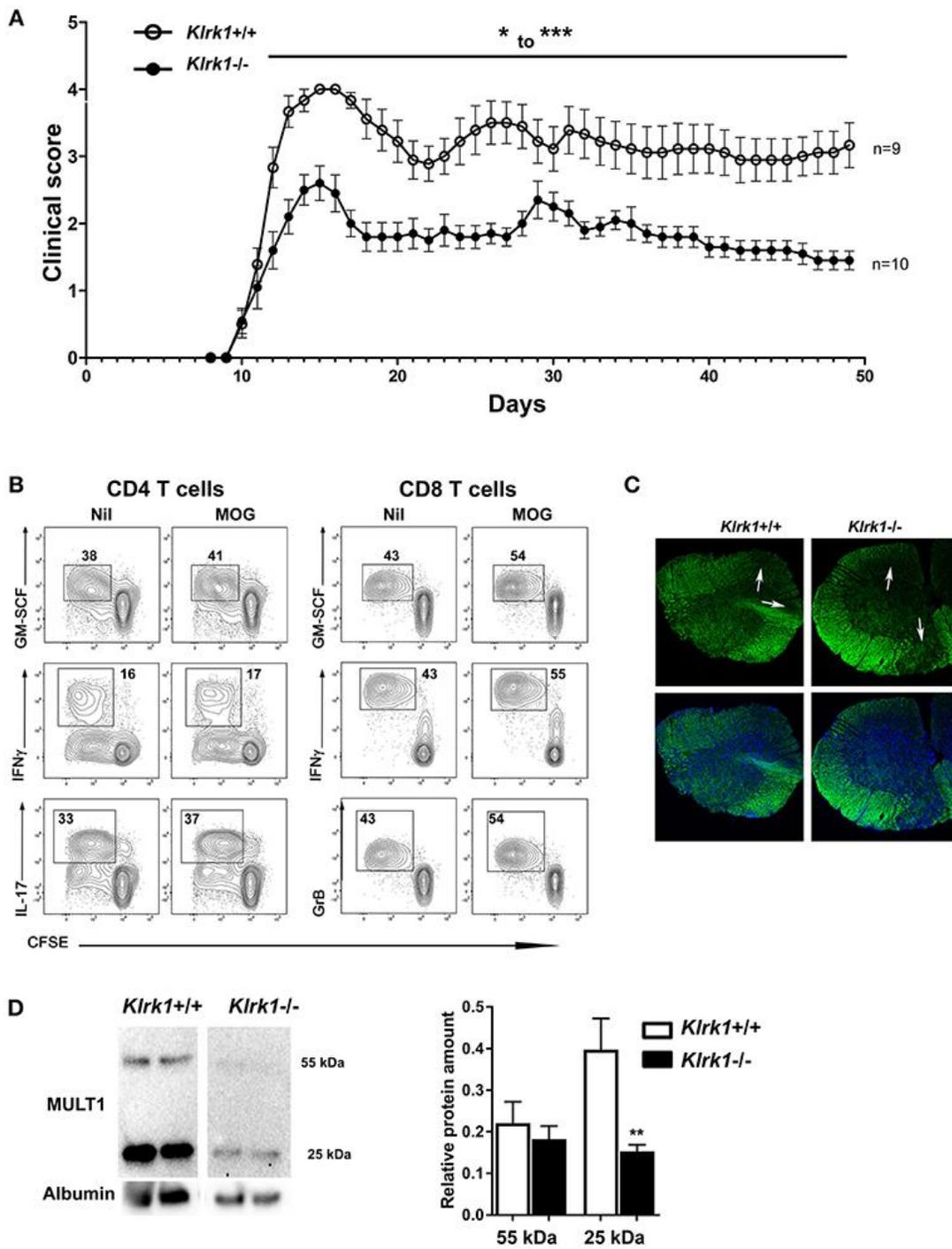


Figure 6: Passive EAE is less severe in *Klrk1*^{-/-} than in wild type recipients

Leukocytes from MOG-immunized C57BL/6 were reactivated *in vitro* and then adoptively transferred to *Klrk1*^{-/-} (black) and wild type (*Klrk1*^{+/+}; white) recipients. A) Mice were followed for clinical score. Mean + SEM, n=9-10. 2way ANOVA *Klrk1*^{-/-} vs. *Klrk1*^{+/+} day

22-23 * $p < 0.05$ for all other days from day 12 to the end: *** $p < 0.001$. B) Flow cytometry analysis of ex vivo expanded T lymphocytes from MOG-immunized donor mice. Lymph node cells were collected, labeled with CFSE, and put in culture as described in materials and methods in the absence or presence of MOG35-55 for 72 h. PMA, ionomycin, brefeldin A and monensin were added for 4 h prior to flow cytometry staining and analysis for intracellular mediators: GM-CSF, IFN γ , IL-17 and Granzyme B (GrB) as indicated. Contour plots illustrate gated events on CD4 or CD8 T cells expanded in vitro in the absence (Nil) or presence of MOG. C) Representative detection of demyelination using fluoromyelin and DAPI in spinal cord sections from Klrk1 $^{-/-}$ and Klrk1 $^{+/+}$ mice. White arrows indicate zones of myelin loss. D) Western blot detection of MULT1 and albumin in CSF from Klrk1 $^{-/-}$ and Klrk1 $^{+/+}$ mice 50 days after the adoptive transfer of activated lymphocytes. One representative western blot is illustrated and quantification of 55kDa and 25kDa forms as relative expression compared to albumin Mean + SEM n= 7. Statistical differences for relative abundance of MULT1 25kDa form Klrk1 $^{+/+}$ vs. Klrk1 $^{-/-}$ ** $p < 0.01$.

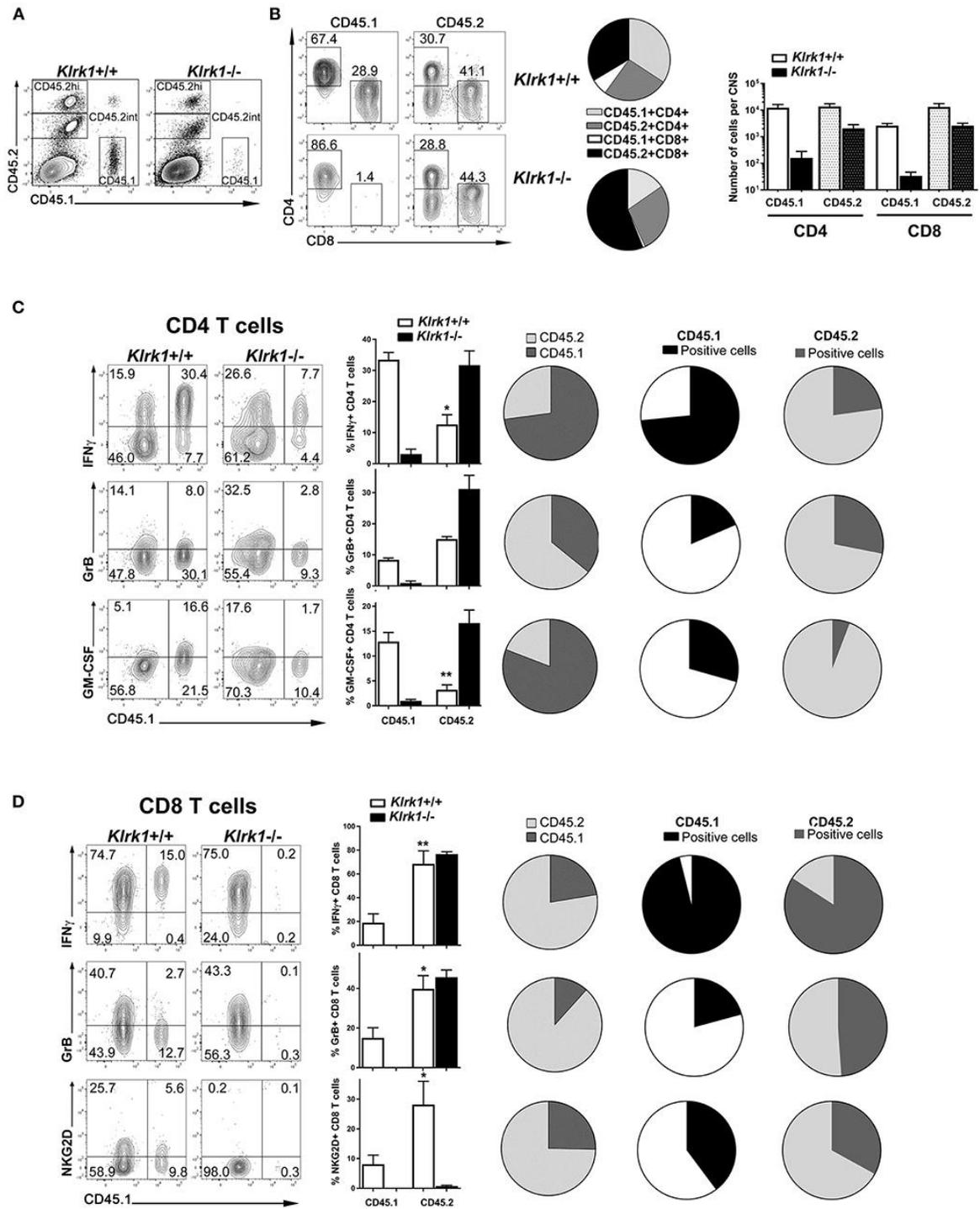


Figure 7: CNS-infiltrated endogenous CD8 lymphocytes exhibit effector functions

Leukocytes from MOG-immunized B6-CD45.1 were reactivated in vitro and then adoptively transferred into CD45.2-expressing *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} mice. Recipients were sacrificed on

day 25 and organs collected for flow cytometry analysis. Cells from donor mice were CD45.1 whereas cells from recipients express the standard C57BL/6 CD45.2 marker. Flow data representative of 3-4 mice per group. A) Representative contour plots of CNS cells in *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} recipient mice showing CD45.1⁺ cells (donor cells) or CD45.2⁺ cells (endogenous cells) amongst all single and living cells. B) Representative contour plots showing CD45.1⁺ or CD45.2⁺ gated cells for CD4 and CD8 T cell detection in *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} recipients. Pie charts illustrate the proportion of CNS-infiltrating CD3 T cells that were either CD45.1⁺CD4⁺, CD45.2⁺CD4⁺, CD45.1⁺CD8⁺, and CD45.2⁺CD8⁺ in *Klrk1*^{+/+} and *Klrk1*^{-/-} mice. Number of cells per CNS (spinal cord and brain pooled from each individual mouse) for CD4 and CD8 T cells that expressed either CD45.1 or CD45.2. Mean + SEM n=3. C-D) Representative contour plots of CNS cells gated either on CD4 (C) or CD8 (D) T cells in *Klrk1*^{-/-} and *Klrk1*^{+/+} recipients showing donor cells (CD45.1⁺) or endogenous cells (CD45.1 negative) producing IFN γ , granzyme B (GrB) or GM-CSF or expressing NKG2D. Bar graphs illustrate mean + SEM n=3-4 individual mice of one representative experiment. Statistical differences for percentage of IFN γ producing CD4 T cells in *Klrk1*^{+/+} : CD45.1 in vs. CD45.2 * p<0.05; percentage of GM-CSF producing CD4 T cells in *Klrk1*^{+/+} : CD45.1 in vs. CD45.2 ** p<0.01; for percentage of IFN γ producing CD8 T cells in *Klrk1*^{+/+} : CD45.1 in vs. CD45.2 ** p<0.01; percentage of granzyme B producing CD8 T cells in *Klrk1*^{+/+} : CD45.1 in vs. CD45.2 * p<0.05; percentage of NKG2D-expressing CD8 T cells in *Klrk1*^{+/+} : CD45.1 in vs. CD45.2 * p<0.05. Pies in first column show proportion of T cells in *Klrk1*^{+/+} recipients producing IFN γ , granzyme B (GrB) or GM-CSF or expressing NKG2D according to the expression of CD45.2 (light grey) or CD45.1 (dark grey). Pies in second (CD45.1) and third (CD45.2) columns illustrate percentage of cells producing IFN γ , granzyme B (GrB) or GM-CSF or expressing .NKG2D within these two subsets.

References

1. L. Legroux and N. Arbour: Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. *J Neuroimmune Pharmacol*, 10(4), 528-46 (2015) doi:10.1007/s11481-015-9614-0
2. C. Baecher-Allan, B. J. Kaskow and H. L. Weiner: Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron*, 97(4), 742-768 (2018) doi:10.1016/j.neuron.2018.01.021
3. L. L. Lanier: NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res*, 3(6), 575-82 (2015) doi:10.1158/2326-6066.CIR-15-0098
4. R. Carapito and S. Bahram: Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol Rev*, 267(1), 88-116 (2015) doi:10.1111/imr.12328
5. A. Stojanovic, M. P. Correia and A. Cerwenka: The NKG2D/NKG2DL Axis in the Crosstalk Between Lymphoid and Myeloid Cells in Health and Disease. *Front Immunol*, 9, 827 (2018) doi:10.3389/fimmu.2018.00827
6. D. H. Raulet, S. Gasser, B. G. Gowen, W. Deng and H. Jung: Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol*, 31, 413-41 (2013) doi:10.1146/annurev-immunol-032712-095951
7. D. H. Raulet, A. Marcus and L. Coscoy: Dysregulated cellular functions and cell stress pathways provide critical cues for activating and targeting natural killer cells to transformed and infected cells. *Immunol Rev*, 280(1), 93-101 (2017) doi:10.1111/imr.12600
8. P. Dhar and J. D. Wu: NKG2D and its ligands in cancer. *Curr Opin Immunol*, 51, 55-61 (2018) doi:10.1016/j.coi.2018.02.004
9. L. N. Carayannopoulos, O. V. Naidenko, D. H. Fremont and W. M. Yokoyama: Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol*, 169(8), 4079-83 (2002)
10. W. Deng, B. G. Gowen, L. Zhang, L. Wang, S. Lau, A. Iannello, J. Xu, T. L. Rovis, N. Xiong and D. H. Raulet: Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science*, 348(6230), 136-9 (2015) doi:10.1126/science.1258867
11. S. T. Cox, R. Danby, D. Hernandez, J. A. Madrigal and A. Saudemont: Functional Characterisation and Analysis of the Soluble NKG2D Ligand Repertoire Detected in Umbilical Cord Blood Plasma. *Front Immunol*, 9, 1282 (2018) doi:10.3389/fimmu.2018.01282
12. R. Carapito, J. E. Gottenberg, I. Kotova, M. Untrau, S. Michel, L. Naegely, I. Aouadi, M. Kwemou, N. Paul, A. Pichot, J. Locke, S. J. Bowman, B. Griffiths, K. L. Sivils, J. Sibia, H.

Inoko, C. Micelli-Richard, G. Nocturne, M. Ota, W. F. Ng, X. Mariette and S. Bahram: A new MHC-linked susceptibility locus for primary Sjogren's syndrome: MICA. *Hum Mol Genet*, 26(13), 2565-2576 (2017) doi:10.1093/hmg/ddx135

13. Z. Dai, C. J. Turtle, G. C. Booth, S. R. Riddell, T. A. Gooley, A. M. Stevens, T. Spies and V. Groh: Normally occurring NKG2D+CD4+ T cells are immunosuppressive and inversely correlated with disease activity in juvenile-onset lupus. *J Exp Med*, 206(4), 793-805 (2009) doi:10.1084/jem.20081648

14. S. Hamada, A. Caballero-Benitez, K. L. Duran, A. M. Stevens, T. Spies and V. Groh: Soluble MICB in Plasma and Urine Explains Population Expansions of NKG2D(+)CD4 T Cells Inpatients with Juvenile-Onset Systemic Lupus Erythematosus. *Open J Immunol*, 7(1), 1-17 (2017) doi:10.4236/oji.2017.71001

15. J. L. Fernandez-Morera, S. Rodriguez-Rodero, C. Lahoz, A. Tunon, A. Astudillo, O. Garcia-Suarez, J. Martinez-Borra, A. Lopez-Vazquez, L. Rodrigo, S. Gonzalez and C. Lopez-Larrea: Soluble MHC class I chain-related protein B serum levels correlate with disease activity

in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum Immunol*, 69(4-5), 235-40 (2008) doi:10.1016/j.humimm.2008.01.021

16. P. Saikali, J. P. Antel, J. Newcombe, Z. Chen, M. Freedman, M. Blain, R. Cayrol, A. Prat, J. A. Hall and N. Arbour: NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurosci*, 27(5), 1220-8 (2007) doi:10.1523/JNEUROSCI.4402-06.2007

17. T. Ruck, S. Bittner, C. C. Gross, J. Breuer, S. Albrecht, S. Korr, K. Gobel, S. Pankratz, C. M. Henschel, N. Schwab, O. Staszewski, M. Prinz, T. Kuhlmann, S. G. Meuth and H. Wiendl: CD4+NKG2D+ T cells exhibit enhanced migratory and encephalitogenic properties in neuroinflammation. *PLoS One*, 8(11), e81455 (2013) doi:10.1371/journal.pone.0081455

18. C. S. Constantinescu, N. Farooqi, K. O'Brien and B. Gran: Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol*, 164(4), 1079-106 (2011) doi:10.1111/j.1476-5381.2011.01302.x

19. N. Guerra, K. Pestal, T. Juarez, J. Beck, K. Tkach, L. Wang and D. H. Raulet: A selective role of NKG2D in inflammatory and autoimmune diseases. *Clin Immunol*, 149(3), 432-9 (2013) doi:10.1016/j.clim.2013.09.003

20. L. Legroux, C. L. Pittet, D. Beauseigle, G. Deblois, A. Prat and N. Arbour: An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytometry. *J Neurosci Methods*, 247, 23-31 (2015) doi:10.1016/j.jneumeth.2015.03.021

21. K. G. Elpek, M. P. Rubinstein, A. Bellemare-Pelletier, A. W. Goldrath and S. J. Turley: Mature natural killer cells with phenotypic and functional alterations accumulate upon sustained stimulation with IL-15/IL-15 α complexes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107(50), 21647-52 (2010) doi:10.1073/pnas.1012128107
22. C. L. Pittet, J. Newcombe, J. P. Antel and N. Arbour: The majority of infiltrating CD8 T lymphocytes in multiple sclerosis lesions is insensitive to enhanced PD-L1 levels on CNS cells. *Glia*, 59(5), 841-56 (2011) doi:10.1002/glia.21158
23. R. Schneider, T. Yaneva, D. Beauseigle, L. El-Khoury and N. Arbour: IL-27 increases the proliferation and effector functions of human naive CD8⁺ T lymphocytes and promotes their development into Tc1 cells. *Eur J Immunol*, 41(1), 47-59 (2011) doi:10.1002/eji.201040804
24. J. E. Gilda and A. V. Gomes: Western blotting using in-gel protein labeling as a normalization control: stain-free technology. *Methods Mol Biol*, 1295, 381-91 (2015) doi:10.1007/978-1-4939-2550-6_27
25. N. Arbour, A. Holz, J. C. Sipe, D. Nanche, J. S. Romine, J. Zyroff and M. B. Oldstone: A new approach for evaluating antigen-specific T cell responses to myelin antigens during the course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol*, 137(1-2), 197-209 (2003)
26. N. Arbour, D. Nanche, D. Homann, R. J. Davis, R. A. Flavell and M. B. Oldstone: c-Jun NH(2)-terminal kinase (JNK)1 and JNK2 signaling pathways have divergent roles in CD8(+) T cell-mediated antiviral immunity. *J Exp Med*, 195(7), 801-10 (2002)
27. S. Malarkannan, P. P. Shih, P. A. Eden, T. Horng, A. R. Zuberi, G. Christianson, D. Roopenian and N. Shastri: The molecular and functional characterization of a dominant minor H antigen, H60. *J Immunol*, 161(7), 3501-9 (1998)
28. L. N. Carayannopoulos, O. V. Naidenko, J. Kinder, E. L. Ho, D. H. Fremont and W. M. Yokoyama: Ligands for murine NKG2D display heterogeneous binding behavior. *Eur J Immunol*, 32(3), 597-605 (2002)
29. M. Lodoen, K. Ogasawara, J. A. Hamerman, H. Arase, J. P. Houchins, E. S. Mocarski and L. L. Lanier: NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med*, 197(10), 1245-53 (2003)
30. M. Djelloul, N. Popa, F. Pelletier, G. Raguenez and J. Boucraut: RAE-1 expression is induced during experimental autoimmune encephalomyelitis and is correlated with microglia cell proliferation. *Brain Behav Immun*, 58, 209-217 (2016) doi:10.1016/j.bbi.2016.07.147
31. I. Bjelobaba, V. Begovic-Kupresanin, S. Pekovic and I. Lavrnja: Animal models of multiple sclerosis: Focus on experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neurosci Res*, 96(6), 1021-1042 (2018) doi:10.1002/jnr.24224

32. J. M. Frischer, S. Bramow, A. Dal-Bianco, C. F. Lucchinetti, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P. S. Sorensen and H. Lassmann: The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain*, 132(Pt 5), 1175-89 (2009) doi:10.1093/brain/awp070
33. A. Junker, J. Ivanidze, J. Malotka, I. Eiglmeier, H. Lassmann, H. Wekerle, E. Meinl, R. Hohlfeld and K. Dornmair: Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain*, 130(Pt 11), 2789-99 (2007) doi:10.1093/brain/awm214
34. H. Lassmann and R. M. Ransohoff: The CD4-Th1 model for multiple sclerosis: a critical [correction of crucial] re-appraisal. *Trends Immunol*, 25(3), 132-7 (2004) doi:10.1016/j.it.2004.01.007
35. H. Neumann, I. M. Medana, J. Bauer and H. Lassmann: Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases. *Trends Neurosci*, 25(6), 313-9 (2002)
36. J. Machado-Santos, E. Saji, A. R. Troscher, M. Paunovic, R. Liblau, G. Gabriely, C. G. Bien, J. Bauer and H. Lassmann: The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8⁺ T lymphocytes and B cells. *Brain*, 141(7), 2066-2082 (2018) doi:10.1093/brain/awy151
37. G. Galazka, A. Jurewicz, W. Orłowski, M. Stasiolek, C. F. Brosnan, C. S. Raine and K. Selmaj: EAE tolerance induction with Hsp70-peptide complexes depends on H60 and NKG2D activity. *J Immunol*, 179(7), 4503-12 (2007)
38. V. W. Yong, R. K. Zabad, S. Agrawal, A. Goncalves Dasilva and L. M. Metz: Elevation of matrix metalloproteinases (MMPs) in multiple sclerosis and impact of immunomodulators. *J Neurol Sci*, 259(1-2), 79-84 (2007) doi:10.1016/j.jns.2006.11.021
39. A. Weaver, A. Goncalves da Silva, R. K. Nuttall, D. R. Edwards, S. D. Shapiro, S. Rivest and V. W. Yong: An elevated matrix metalloproteinase (MMP) in an animal model of multiple sclerosis is protective by affecting Th1/Th2 polarization. *FASEB J*, 19(12), 1668-70 (2005) doi:10.1096/fj.04-2030fje
40. E. Narni-Mancinelli and E. Vivier: Shed NKG2D ligand boosts NK cell immunity. *Cell Res*, 25(6), 651-2 (2015) doi:10.1038/cr.2015.41
41. A. Zingoni, R. Molfetta, C. Fionda, A. Soriani, R. Paolini, M. Cippitelli, C. Cerboni and A. Santoni: NKG2D and Its Ligands: "One for All, All for One". *Front Immunol*, 9, 476 (2018) doi:10.3389/fimmu.2018.00476
42. M. Allez, B. E. Skolnick, M. Wisniewska-Jarosinska, R. Petryka and R. V. Overgaard: Anti-NKG2D monoclonal antibody (NNC0142-0002) in active Crohn's disease: a randomised controlled trial. *Gut*, 66(11), 1918-1925 (2017) doi:10.1136/gutjnl-2016-311824

Chapitre 3 : Discussion/Conclusion

De multiples études ont pointé un rôle de NKG2D et ses ligands dans les maladies inflammatoires et auto-immunes à la fois chez l'humain et dans les modèles murins de ces maladies. De nombreuses données suggèrent que l'interaction du NKG2D avec ses ligands (NKG2DL) exacerbe des maladies comme l'arthrite rhumatoïde, la maladie cœliaque, le psoriasis, la maladie de Crohn, le diabète de type I ou la SEP (Allez et al., 2007; Andersson et al., 2011; Fernandez-Morera et al., 2008a; Groh et al., 2003; Ito et al., 2008; Ogasawara et al., 2004; Saikali et al., 2007; Xia et al., 2011). Au début de mon doctorat, peu de données étaient disponibles sur le rôle du NKG2D et ses ligands dans la SEP ou l'EAE. Seulement trois études avaient été publiées, deux chez l'humain dont une menée dans notre laboratoire et une dans l'EAE (Fernandez-Morera et al., 2008a; Galazka et al., 2007; Saikali et al., 2007). L'étude menée dans notre laboratoire suggère un rôle délétère de l'interaction NKG2D-NKG2DL. Nous avons montré que les oligodendrocytes humains exprimant les ligands MICA/B pouvaient être ciblés et éliminés par des cellules immunes effectrices exprimant le NKG2D (LT CD8 activés, cellules NK, LT gamma/delta activés). L'autre étude (Fernandez-Morera et al., 2008a) menée chez l'humain est plus descriptive et ne met pas en avant de mécanisme. Par contre, l'étude menée dans l'EAE (Galazka et al., 2007) suggère un rôle protecteur de NKG2D grâce à une fonction immuno-régulatrice des cellules NK exprimant le récepteur. Face à ces deux études contradictoires, il était essentiel d'approfondir le rôle du NKG2D et de ses ligands afin de déterminer s'ils pouvaient être une bonne cible thérapeutique.

La cytométrie en flux est une technique puissante et très utilisée pour les études en immunologie. Au début de nos expériences nous nous sommes vite aperçus que les protocoles existants étaient peu adaptés pour l'étude simultanée du système immunitaire et du SNC dans des modèles murins de maladies du SNC. Nous avons donc trouvé nécessaire de développer et optimiser un protocole permettant de maximiser à la fois la détection des cellules immunitaires ayant infiltré le SNC et des cellules neurales.

1.0 Article 1: An optimized method to process mouse CNS to simultaneously analyze neural cells and leukocytes by flow cytométrie

Mon premier article a pour sujet l'optimisation d'un protocole de préparation des cellules du SNC de souris afin de détecter simultanément les cellules neurales et immunitaires en cytométrie en flux. Cette technique est un outil classiquement utilisé pour analyser les cellules immunitaires mais peu pour analyser les cellules neurales. La SEP est clairement établie comme une maladie inflammatoire du SNC, par conséquent, une technique permettant d'évaluer à la fois les cellules neurales et immunitaires est un bon outil pour étudier cette maladie. De multiples études ont mis en évidence, ces dernières années, une implication du SI dans divers maladies du SNC comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la dépression ou encore les spectres de l'autisme (Skaper et al., 2018). Un protocole optimisé de cytométrie en flux, permettant la détection simultanée des cellules neurales et immunitaires, est d'autant plus intéressant qu'il peut s'appliquer à la fois à l'étude de modèles murins de la SEP mais aussi de multiples autres maladies du SNC.

J'ai donc mis au point un protocole de digestion du tissu avec collagénase D+DNase accompagnée d'une étape de Percoll permettant de détecter un nombre optimal de LT, microglies, microglies activées et macrophages ainsi que des oligodendrocytes et des neurones (Fig. 1-2-3 de l'article). De façon intéressante, ce protocole permet la détection de cellules neurales, mais aussi d'un nombre plus important de cellules immunitaires que les autres protocoles de digestion, l'absence de digestion ou d'autres façons d'utiliser le Percoll (Fig. 2-3 de l'article). Ceci permet d'avoir, à partir d'un seul animal, un nombre suffisant de cellules infiltrant le SNC pour une analyse en cytométrie en flux. Comme il n'est pas nécessaire avec ce protocole de réunir plusieurs SNC, le nombre d'animaux utilisés par étude est restreint. Nous avons par exemple assez de matériel pour pouvoir comparer les cellules immunitaires et neurales provenant d'une souris naïve, avec une souris au pic de l'EAE (Fig. 4 de l'article).

En revanche, je n'ai pas réussi à obtenir des astrocytes simples positifs en cytométrie en flux à partir du SNC. Autrement dit, les marqueurs d'astrocytes que j'ai testés en

cytométrie (GFAP, astrocyte cell surface antigen (ACSA) 1 et 2) identifiaient des cellules positives pour le marqueur de neurones (NeuN, Fig. 9). Mon hypothèse est que ce protocole ne permet pas de détacher correctement tous les pieds astrocytaires des neurones et des oligodendrocytes. Je n'ai pas trouvé de digestion assez forte pour détacher tous les pieds astrocytaires tout en préservant les cellules fragiles que sont les neurones. Par contre, dans le cadre d'une collaboration avec l'équipe de la Dre Di Polo nous avons utilisé ce protocole sur des rétines de rat. Nous avons pu avoir des marquages simples positifs pour les neurones et les astrocytes (glie de Müller), même s'il reste quelques cellules ayant un double marquage (Fig. 9). Ceci découle probablement du fait que la rétine, comparée aux autres structures du SNC, a une organisation moins entremêlée donc plus facile à digérer (London et al., 2013).

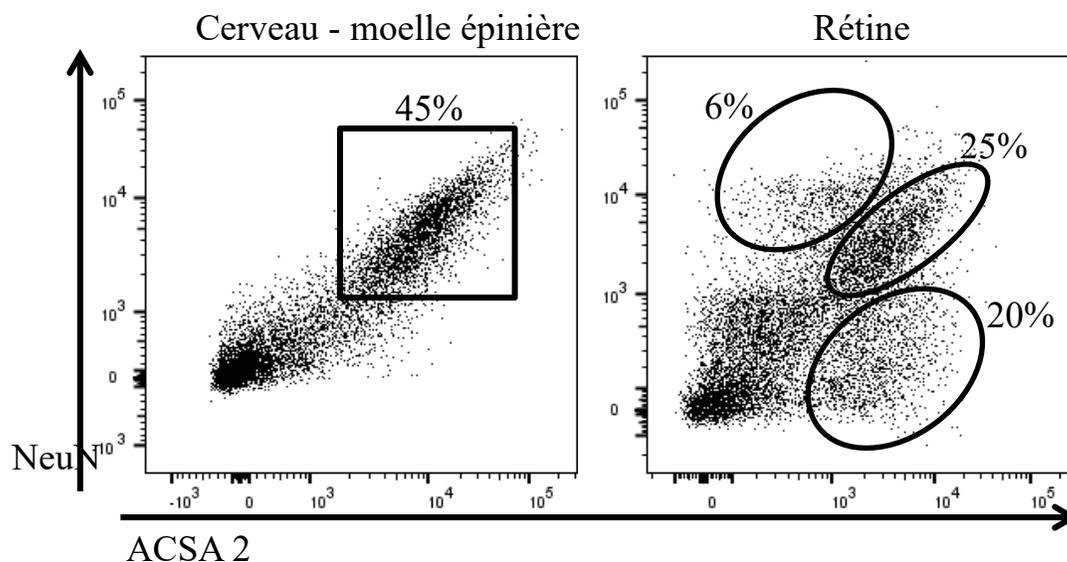


Figure 9 : Dots plot représentant les neurones (NeuN) et les astrocytes (ACSA2). SNC ou rétine digérés avec de la collagénase D+DNase et cellules isolées par une centrifugation avec du Percoll 37%.

Il est aussi intéressant de noter que suite au protocole de digestion et l'étape de Percoll, les oligodendrocytes restent viables pour être utilisés dans des expériences de culture *in vitro*. En effet, ceci a été effectué par les membres du laboratoire de la Dre Catherine Larochelle.

Dans le cadre de mon projet portant sur le NKG2D, le but final de cette optimisation était de pouvoir analyser à la fois les cellules infiltrant le SNC exprimant le NKG2D et les cellules neurales exprimant les ligands de NKG2D au cours de l'EAE. Mes résultats de RT-qPCR montrent une augmentation spécifique d'un ligand de NKG2D (MULT1) au pic de l'EAE. Par conséquent, j'ai utilisé cette méthode de cytométrie pour analyser l'expression de MULT1 au niveau protéique et déterminer le phénotype des cellules l'exprimant *ex vivo*. Malheureusement, je n'ai pas obtenu de résultats satisfaisants. J'ai plusieurs hypothèses pouvant expliquer ceci. Premièrement, les outils disponibles (anticorps) pour détecter MULT1 sont limités. Deuxièmement, il est possible que MULT1 soit exprimé sur des cellules autres que celles analysées en cytométrie de flux. Par exemple, MULT1 pourrait être exprimé sur les astrocytes ou les cellules endothéliales. En outre, le pourcentage de cellules exprimant le MULT1, est probablement trop faible pour pouvoir être analysé sans regarder son expression sur un type cellulaire particulier. D'autant plus que mes expériences suivantes ont montré que le MULT1 est principalement retrouvé dans les tissus sous sa forme clivée, donc non détectable en cytométrie. (Fig. 3 de l'article « *NKG2D and its ligands MULT1 contribute to disease progression in a mouse model of multiple sclerosis* »).

2.0 Article 2: NKG2D and its ligand MULT1 contribute to disease progression in a mouse model of multiple sclerosis

Mon second article porte sur le rôle du NKG2D et ses ligands dans un modèle murin de la SEP appelé EAE. Les objectifs de mon projet de doctorat étaient de disséquer le mécanisme d'action de NKG2D et son implication dans un modèle de la SEP. Ainsi, je voulais déterminer si bloquer l'interaction NKG2D-NKG2DL pouvait constituer une bonne stratégie thérapeutique. Pour ceci nous avons choisi d'utiliser un modèle de la SEP afin de pouvoir agir *in vivo* et déterminer s'il était possible de modifier l'évolution de la maladie en intervenant sur la voie NKG2D-NKG2DL. L'EAE est le modèle récapitulant le mieux le côté inflammatoire de la SEP. Par conséquent, c'est celui qui nous avait semblé le plus approprié pour l'étude du récepteur ou corécepteur de cellules immunitaires qu'est NKG2D.

2.1 Rôle de NKG2D

Nous avons caractérisé et comparé l'évolution de la maladie chez les souris sauvages et déficientes pour NKG2D. Nous n'avons mis en évidence qu'une très faible et transitoire différence dans l'EAE active, en condition optimale, entre les deux génotypes de souris (Fig. 1A de l'article). L'équipe du Dr Raulet a publié des résultats en EAE active avec les souris *Klrk1* *+/+* et *Klrk1* *-/-* en condition normale et sous optimale. Pour la condition sous optimale, ils ont induit l'EAE en utilisant une concentration de MOG 5 fois inférieure à la normale. Les souris n'exprimant pas le NKG2D ont été moins malades que les souris sauvages en condition sous optimale mais aucune différence significative n'a été observée en condition optimale (Guerra et al., 2013). Le NKG2D est exprimé sur les NK, les NKT, les LT CD8 activés ainsi qu'une sous population de LT CD4 activés et de LT $\gamma\delta$. En outre, l'EAE active est une maladie caractérisée par une infiltration majoritaire de LT CD4. Nous l'avons confirmé dans nos modèles, que ce soit chez les souris sauvages ou déficientes, environ 5 fois plus de LT CD4 que de LT CD8 infiltraient le SNC (75% vs 15% des LT) (Fig. 1B-D de l'article). On retrouvait très peu de cellules NK, NKT et LT $\gamma\delta$ (moins de 2% chacun) infiltrant le SNC (données non montrées). Le fait, que les cellules exprimant NKG2D représentent un faible pourcentage des cellules ayant infiltrées le SNC peut expliquer que, contrairement à ce qu'on espérait, l'absence de NKG2D ne suffit pas à modifier significativement l'évolution de l'EAE active en condition optimale. Par contre en condition sous optimale, l'EAE active est atténuée en absence de NKG2D suggérant que ce récepteur a un rôle délétère dans le développement de la maladie qui ne peut pas être mis en évidence quand la maladie est trop intense.

Une autre stratégie pour étudier le rôle de NKG2D dans le développement de l'EAE est de bloquer l'interaction NKG2D-NKG2DL. Ceci a été effectué par l'équipe du Dr Wiendl (Ruck et al., 2013). Ils ont utilisé soit un anticorps bloquant NKG2D en prophylaxie soit le récepteur NKG2D soluble en prophylaxie ou en thérapeutique. Dans les deux cas, le devenir de la maladie est amélioré quand l'administration de la molécule est faite avant le début de la maladie. Avec l'anticorps bloquant, l'EAE est moins sévère. Avec le NKG2D soluble, le début de la maladie est retardé et la sévérité de la maladie est atténuée. Par contre, l'injection du NKG2D soluble au début de la maladie ne procure aucune protection vis à vis du développement de l'EAE (Ruck et al., 2013).

Pour notre étude, nous avons choisi d'utiliser un modèle passif. Ce modèle permet, contrairement au modèle actif de passer outre les étapes d'activation des cellules nécessaires à l'initiation de la maladie. La première étape d'activation se fait dans des souris C57BL/6J obtenues de chez Jackson Laboratories immunisées avec le MOG35-55, le CFA et injectées au PTX. La seconde étape de ré-activation se fait *in vitro* avec du MOG et les cytokines suivantes IL2, IL15-IL15R α et IL12. Les cellules sont ensuite injectées par voie intra-péritonéale dans des souris receveuses naïves, sauvages ou déficientes pour le NKG2D. Les souris reçoivent du PTX au deuxième jour comme pour le modèle actif. Les deux groupes de souris ont été injectés avec exactement les mêmes cellules qui expriment NKG2D, nous permettant de déterminer spécifiquement le rôle du NKG2D endogène. Autrement dit, cette technique permet de faire l'emphase sur le rôle de NKG2D dans les étapes de progression de l'EAE en mettant de côté les deux phases d'activation des LT (ayant eu lieu dans les souris donneuses et *in vitro*) ainsi que la phase d'initiation de la maladie dans les souris receveuses (puisqu'elles reçoivent les mêmes cellules exprimant NKG2D). Ceci permet également d'outre passer l'impact potentiel du CFA sur l'expression de NKG2D et ses ligands même si dans notre modèle l'expression en ARNm des NKG2DL n'est pas modifiée par le CFA (données non montrées). Dans un modèle de diabète de type 1, le CFA est protecteur vis à vis du développement de la maladie. Il permet d'augmenter l'expression de NKG2D mais en même temps de diminuer l'expression de ces ligands résultant d'une réduction du nombre de LT cytotoxiques (Lee et al., 2008a; Lee et al., 2004).

Nous avons mis en évidence que les souris receveuses déficientes pour le NKG2D présentent une maladie atténuée par rapport aux souris receveuses sauvages (Fig. 6A de l'article). Les premiers symptômes ont commencé au même moment pour les deux groupes de souris mais les scores cliniques correspondant au pic de la maladie étaient plus faibles chez les souris receveuses déficientes pour NKG2D que chez les souris sauvages (Fig. 6A de l'article). De même, la maladie était moins sévère durant la phase chronique de l'EAE chez les souris receveuses déficientes pour NKG2D que chez les souris sauvages (Fig. 6A de l'article).

Plusieurs thérapies actuellement utilisées dans le traitement de la SEP ciblent l'activation des LT (acétate de glatiramère, tériflunomade) (Tullman, 2013). NKG2D est un co-récepteur activateur des LT CD8, son expression est donc potentiellement modulée à la

baisse par ces thérapies et il serait intéressant de l'analyser chez ces patients. Ainsi, si l'expression du récepteur est effectivement baissée, nos données montrant une EAE moins sévère chez les souris déficientes pour NKG2D par rapport aux souris sauvages après transfert de cellules immunes activées pourraient étayer en partie l'effet bénéfique de ces thérapies (Fig. 6A de l'article).

A la fois les cellules endogènes et exogènes sont capables de produire des facteurs solubles associés aux fonctions effectrices (Fig. 7C et D de l'article). En outre en concordance avec les scores cliniques, les souris sauvages avaient plus de cellules infiltrant leur SNC que les souris déficientes pour NKG2D (Fig. 7A et B de l'article). L'origine des cellules infiltrantes était majoritairement endogène chez les deux souches de souris (Fig. 7A et B de l'article). Par conséquent, les cellules transférées ont été importantes pour induire la maladie dans les souris receveuses mais nos résultats suggèrent que les cellules endogènes sont primordiales pour permettre la progression de la maladie.

L'avantage de notre approche, par rapport à l'étude de l'EAE active dans des souris *Klrk1* $+/+$ et *Klrk1* $-/-$, est d'isoler le rôle de NKG2D dans une étape précise du développement de la maladie. En outre, il s'agit de la période correspondant à la fenêtre thérapeutique chez les patients. Notre étude permet de déterminer si l'absence de NKG2D, après le début de la maladie permet de modifier son évolution et donc si NKG2D représente une bonne cible thérapeutique. Nos résultats vont dans ce sens, en effet l'absence de NKG2D a engendré une protection significative des souris receveuses vis à vis de l'EAE. Nous pouvons faire le parallèle entre notre approche et l'utilisation du NKG2D soluble en thérapie dans l'étude décrite préalablement (Ruck et al., 2013). Leur résultat négatif, contrairement au nôtre, peut s'expliquer par le fait que lors des premiers symptômes les mécanismes pathologiques sont déjà trop avancés. L'EAE est une maladie qui se développe rapidement, il n'y a que 2 à 3 jours entre le début de la maladie et le pic. La fenêtre thérapeutique est peut-être trop courte, dans le modèle actif, pour mettre en évidence le rôle protecteur du blocage de NKG2D après le début des symptômes. Chez une majorité de patients, la SEP est une maladie à une évolution lente avec des poussées et des rémissions étendues sur plusieurs dizaines d'années. La fenêtre thérapeutique est donc assez large pour pouvoir espérer un impact d'une potentielle thérapie bloquant NKG2D ou ses ligands. De plus, les mécanismes lymphocytaires

détaillés précédemment, propres aux modèles actif et passif peuvent également expliquer cette différence de résultats.

Pour la ré-activation *in vitro*, nous avons utilisé des cytokines qui favorisent la survie et l'activation des LT CD8 par rapport aux LT CD4. Ceci permet d'obtenir autant de LT CD4 que CD8, après les 72h de culture, à injecter aux souris receveuses. L'analyse des cellules, à la fin de l'EAE, a mis en évidence qu'une faible proportion de LT CD8 transférés a infiltré le SNC des souris sauvages et déficientes pour NKG2D (Fig. 7A et B de l'article). Par contre, une quantité similaire de LT CD4 transférés et endogènes et de LT CD8 endogènes ont infiltré le SNC des souris sauvages (Fig. 7A et B de l'article). Ainsi chez les souris sauvages, notre modèle a fait intervenir environ 40% de LT CD8 soit 2 fois plus que dans le modèle actif. Chez les souris déficientes pour NKG2D, peu de cellules ont infiltrés le SNC comparé aux souris sauvages mais une majorité étaient des LT CD8 endogènes (environ 65%) soit 3 fois plus que dans le modèle actif (Fig 7A et B de l'article).

De multiples études ont mis en évidence la contribution des LT CD8 dans le développement de la SEP (Mars et al., 2011). Autant, voire plus de LT CD8 que CD4 sont présents dans les lésions périvasculaires et du parenchyme cérébral des patients atteints de la SEP (Babbe et al., 2000; Frischer et al., 2009; Gay et al., 1997; Hauser et al., 1986; Junker et al., 2007; Lassmann, 2004; Neumann et al., 2002). Une étude récente suggère une dominance des LT CD8 à tous les stades de la maladie et dans les différents types de lésions par rapport aux LT CD4. Les auteurs mettent en évidence qu'une part des LT CD8 infiltrants, qui présentent un phénotype cytotoxique activé prolifératif, sont détruits par apoptose. Les cellules restantes semblent devenir des cellules mémoires résidentes qui peuvent être réactivées localement au niveau des lésions aiguës actives lors des rechutes et de la progression de la SEP (Machado-Santos et al., 2018). Ceci appuie l'importance des LT CD8 dans les réponses inflammatoires des lésions de SEP, notamment par leurs capacités à être réactivées après réexposition à un antigène spécifique. Nous pensons donc que notre approche permet à la fois d'avoir un modèle avec plus de cellules qui expriment le NKG2D mais aussi d'être plus proche de la physiopathologie de la SEP. En outre, dans l'étude du Dr. Wiendl, il est possible que le NKG2D soluble injecté après le début de la maladie n'ait pas eu d'effet car trop peu de cellules exprimant NKG2D interviennent dans ce modèle d'EAE active (Ruck et al., 2013).

Par contre, notre modèle ne nous permet pas d'étudier un autre type cellulaire impliqué dans la SEP et exprimant NKG2D que sont les cellules NK. Une équipe a montré que l'interaction de NKG2D, exprimé sur les cellules NK, avec son ligand H60 permettait de prévenir l'EAE (Galazka et al., 2014; Galazka et al., 2007). En outre, les études concernant le rôle des NK dans la SEP ou l'EAE sont contradictoires, certaines mettent en évidence que ces cellules peuvent promouvoir la maladie d'autres qu'elles peuvent protéger contre la progression de la maladie. Il est probable que les NK aient un rôle immuno-modulateur dans les maladies auto-immunes avec des fonctions opposées suivant leur localisation dans le tissu, le statut inflammatoire et infectieux ainsi que l'âge et la génétique des individus (Johansson et al., 2005). Galazka et ses collègues (Galazka et al., 2007) avaient observé le rôle protecteur de NKG2D uniquement chez les souris SJL/L mais pas chez les souris C57BL/6. Ils expliquaient ceci par le fait que ces dernières n'expriment pas H60 contrairement aux souris SJL/L. Bien que cela ne soit pas précisé dans le texte, il s'agit probablement du ligand H60a qui est présent chez les souris SJL/L et non chez les souris C57BL/6 puisque les autres H60 (b et c) sont présents chez les deux souches de souris. Pour notre étude, nous avons utilisé des souris de souche C57BL/6 car elles ont l'avantage d'être disponibles commercialement chez Jackson Laboratories, déficientes pour NKG2D.

2.2 Les ligands de NKG2D

2.2.1 Forme entière de MULT1

Nous avons caractérisé l'expression des ligands de NKG2D aux différents stades de l'EAE et chez les souris témoins au niveau de l'ARNm et au niveau des protéines. L'objectif était de déterminer si certains ligands étaient surexprimés au cours du développement de la maladie et plus spécifiquement dans le SNC où se trouvent les lésions. Nous avons principalement observé l'augmentation d'un ligand spécifique du NKG2D, le MULT1, dans le SNC au pic de l'EAE, chez les souris *Klrk1* *+/+* et *Klrk1* *-/-* (Fig. 3 de l'article). Ceci a été observé à la fois en ARNm et au niveau protéique. L'expression de cette protéine dans les organes témoins n'avait pas varié de façon significative en fonction de l'évolution de l'EAE chez nos deux génotypes de souris en ARNm (Fig. 3B de l'article). De façon intéressante, ce ligand était plus exprimé dans la partie du SNC la plus touchée dans l'EAE qu'est la moelle

épineière par rapport au tronc cérébral, au cervelet et au cerveau antérieur (Fig. 3 de l'article). A ma connaissance, aucune autre étude n'a mis en évidence une augmentation de MULT1 au niveau protéique dans un modèle de la SEP. Par contre, dans le cadre d'autres pathologies inflammatoires ou infectieuses, une augmentation de la protéine MULT1 a été observée au niveau des cellules épithéliales intestinales (Hosomi et al., 2017; Li et al., 2012).

Au niveau de l'ARNm, l'expression était significativement plus importante chez les souris déficientes pour NKG2D que chez les souris sauvages (Fig. 3A de l'article). Ceci laisse suggérer que les cellules exprimant les ligands ne sont pas détruites en l'absence de NKG2D ou que l'interaction NKG2D-MULT1 est responsable d'une régulation négative de MULT1 ne pouvant pas se produire chez les souris déficientes pour le récepteur. En revanche, contrairement aux résultats de RT-qPCR, nous n'avons pas observé de différences significatives d'expression entre les souris *Klrk1* *+/+* et *Klrk1* *-/-* au niveau protéique (Fig. 3C-F de l'article). Nous avons utilisé une méthode d'immunobuvardage de type western qui est une méthode semi-quantitative qui permet de mettre en évidence des différences importantes d'expression de protéines contrairement à la RT-qPCR qui est une méthode quantitative d'analyse d'expression de l'ARNm. Il se peut qu'il n'y ait pas de différences d'expression de MULT1 au niveau protéique entre les échantillons venant des deux génotypes de souris ou qu'elles soient trop faibles pour pouvoir être détectées par cette technique.

L'expression des autres ligands de NKG2D, *Rae-1* et *H60b* n'était pas ou peu modulée au cours de la maladie chez nos deux génotypes de souris (Fig. 2A de l'article). Le *H60c* n'était pas détectable dans le SNC et nos organes témoins. Nous avons également inclus des souris naïves, qui n'avaient subi aucune intervention, dans nos analyses. Nos résultats étaient identiques pour nos souris naïves et témoins donc le CFA et la PTX n'induisent pas l'expression des NKG2DL qui est bien liée au développement de l'EAE.

Dans un autre modèle de la SEP, une induction des ligands de NKG2D au niveau de l'ARNm est également observée dans la moelle épinière. Il s'agit de souris BALB/c infectées avec la souche JHM du MHV. Par contre, contrairement à ce que nous avons mis en évidence dans notre modèle, une augmentation de l'expression des trois ligands de NKG2D (*MULT1*, *Rae-1* et *H60*) est observée (Walsh et al., 2008). L'équipe du Dr. Boucraut, a publié une étude sur l'expression en ARNm des ligands de NKG2D au cours du développement de l'EAE (Djelloul et al., 2016). Ils n'ont pas mis en évidence d'augmentation importante de *H60b* et ils

observent une augmentation de l'expression de Rae-1 δ et ε au pic de l'EAE dans la moelle épinière lombaire. Ces résultats concordent avec les miens même si l'augmentation de Rae-1 que j'observe est moins importante que la leur. Ils ont également montré une augmentation de l'ARNm codant pour MULT1 au cours du développement de l'EAE dans la moelle épinière lombaire mais plus précoce que ce que j'ai observé. Les différences proviennent probablement du fait qu'ils ont analysé la moelle épinière lombaire alors que j'ai analysé la moelle épinière au complet. De plus l'EAE est caractérisée par une paralysie ascendante, la moelle épinière lombaire est donc atteinte avant la moelle épinière cervicale expliquant sûrement l'augmentation de MULT1 plus précoce dans leur étude que dans la mienne. En outre, ils n'ont pas fait d'analyse des autres parties du SNC, des souris déficientes pour NKG2D et n'ont pas investigué l'expression au niveau protéique des ligands. Comme détaillé dans l'introduction (paragraphe 3.2), les ligands de NKG2D sont régulés au niveau des gènes, des transcrits et des protéines. Notamment, MULT1 et Rae-1 peuvent être régulés au niveau post-transcriptionnel (Raulet et al., 2013), il est donc essentiel d'analyser leur expression au niveau protéique pour déterminer leur implication potentiel dans l'EAE.

Nous avons déterminé que l'expression de RAE-1 au niveau protéique était stable au cours des différents stades de l'EAE et par rapport au témoin (Fig. 2B et C de l'article). Il est difficile d'analyser les différents isoformes de RAE-1 en raison de leur grande homologie, leurs séquences sont à plus de 92% identiques (Strong, 2002). Il n'y a pas d'anticorps commercialement disponibles permettant leur discrimination.

2.2.2 Forme soluble de MULT1

Nous avons observé deux bandes : une à environ 55kDa et une autre à environ 25kDa (Fig. 3C et E de l'article). MULT1 est une protéine de 53kDa, son précurseur possède 334 acides aminés (aa) dont 25 aa correspondent à la séquence signal, 186 aa à la région extracellulaire, 19 aa à la région transmembranaire et 109 aa à la queue cytoplasmique. A la lumière de la répartition des aa, nous pensons que la première bande (55kDa) correspond à la protéine totale et que la seconde bande (25kDa) correspond à la partie extracellulaire de MULT1 clivée et libérée dans l'espace extracellulaire. Ceci est appuyé par une étude de l'équipe du Dr Raulet qui a mis en évidence que MULT1 peut être clivée dans certaines conditions et que cette protéine soluble migre sur gel d'acrylamide à environ 25kDa (Deng et

al., 2015). Dans cette étude, le clivage de MULT1 a été inhibé par l'inhibiteur des MMP1, 2, 3, 7 et 9, appelé BB-94. Il a été prouvé que l'expression de certaines MMP est augmentée au cours de l'EAE comme les MMP2, 3 et 9, ceci nous conforte dans la possibilité du clivage de MULT1 (Boziki and Grigoriadis, 2018; Weaver et al., 2005). En outre, la protéine MULT1 était 4.5 fois plus abondante sous sa forme clivée que sous sa forme pleine dans le SNC (Fig. 3D et F de l'article). Nous avons donc mis en évidence, pour la première fois, que MULT1 était augmenté au cours du développement de l'EAE active au niveau protéique et qu'il pouvait à la fois être présent dans sa forme complète (55kD) potentiellement à la membrane cellulaire et être présent sous forme soluble (25kDa).

Le clivage des ligands de NKG2D est un mécanisme d'évasion bien connu et décrit dans les cancers (Cao et al., 2007; Chitadze et al., 2013; Paschen et al., 2009; Rebmann et al., 2007; Tamaki et al., 2010) (détails dans le paragraphes 3.3.1 de l'introduction). Toutefois, beaucoup moins d'informations sont disponibles dans le cadre de maladies auto-immunes ou inflammatoires. Un seul article démontre la présence de ligands solubles de NKG2D dans le sérum de patients atteints de la SEP (Fernandez-Morera et al., 2008a). Alors que le taux de MICA soluble est similaire entre les témoins et les patients atteints de la SEP, la quantité de MICB soluble est augmentée chez les patients comparés aux témoins et principalement pendant les rechutes. A ma connaissance, aucune étude n'a prouvé la présence de ligands de NKG2D solubles dans des modèles animaux de maladies auto-immunes ou inflammatoires.

Nos résultats nous ont poussés à analyser la présence potentielle de MULT1 soluble au niveau du liquide biologique du SNC, le LCS. Nous parvenons à obtenir quelques microlitres de LCS au niveau de la cisterna magna pour être analysé par immunobuvardage de type western. Comme dans le SNC, l'expression de MULT1 était augmentée au pic de l'EAE (Fig. 4A et B de l'article). Nous avons détecté 7 fois plus de MULT1 sous sa forme clivée que sa forme totale dans le LCS (Fig. 4C de l'article).

En outre, le clivage de MULT1 ne semble pas avoir le même effet que celui des autres NKG2DL. Dans l'étude de l'équipe du Dr Raulet énoncée précédemment, MULT1 soluble augmente les réponses effectrices des cellules NK permettant d'améliorer l'élimination des cellules tumorales (Deng et al., 2015). En effet, suite à l'interaction NKG2D-MULT1, les cellules NK augmentent leur nombre de récepteurs NKG2D et leur production d'IFN γ . Ce rôle

de MULT1 soluble va à l'encontre des autres ligands solubles de NKG2D qui désensibilisent les cellules. Plus la quantité de NKG2DL soluble détectée est importante plus le pronostic des patients atteints de cancer ou des modèles animaux est mauvais, excepté pour le MULT1 soluble qui améliore l'évolution de la maladie (Chitadze et al., 2013). Le mécanisme d'action de MULT1 soluble suggéré par l'équipe du Dr Raullet est une restauration des fonctions des cellules NK désensibilisées par les interactions répétées NKG2D-NKG2DL. MULT1 est le ligand murin de NKG2D ayant la plus grande affinité pour son récepteur (Carayannopoulos et al., 2002a). La compétition, pour la fixation de NKG2D, en faveur de MULT1 soluble par rapport aux autres NKG2DL permet aux cellules NK de rester activées et d'éliminer les cellules tumorales. Chez les patients atteints de la SEP, les LT sont détectés en abondance dans le LCS (Wu and Alvarez, 2011). Il est donc intéressant d'analyser l'impact de MULT1 soluble sur les LT et de déterminer si leurs fonctions effectrices sont boostées comme celles des cellules NK. Pour cela, nous avons mis en culture des LT CD8 activés en présence de la protéine recombinante MULT1 et nous avons analysé l'expression de facteurs solubles impliqués dans la SEP et l'EAE. La séquence de la protéine recombinante MULT1 correspond à la partie extracellulaire de MULT1 donc à la protéine soluble. Nous avons mis en évidence que l'expression d'IFN γ par LT CD8 (Klrk1 +/+) était significativement plus importante après exposition avec la protéine recombinante MULT1 (Fig. 5A et C de l'article). Le pourcentage de GrB sur les LT CD8 ainsi que son expression cellulaire étaient augmentés après traitement des cellules avec la protéine recombinante MULT1 (Fig. 5A-C de l'article). On peut conclure que l'interaction NKG2D avec la protéine recombinante MULT1 augmente les fonctions effectrices des cellules immunitaires et notamment des LT CD8.

Dans l'étude de Ruck et ses collègues énoncée précédemment, le NKG2D soluble semble plus efficace pour protéger les souris de l'EAE que l'anticorps bloquant. Au regard de nos résultats, on peut supposer que cette différence repose sur la capacité du NKG2D soluble à se fixer au MULT1 soluble en plus d'empêcher l'interaction NKG2D-NKG2DL, contrairement à l'anticorps bloquant anti-NKG2D qui bloque seulement l'interaction NKG2D-NKG2DL (Ruck et al., 2013).

En outre, MULT1 semble augmenter la sécrétion d'IFN γ par les splénocytes et les LT CD8 mais pas d'IL17 (Fig. 10). Cette interaction NKG2D-MULT1 semble donc orienter une

différentiation Th1/Tc1 et non Th17/Tc17. Ceci concorde avec ce qui est connu dans la littérature. La costimulation de NKG2D sur les LT CD8 murins permet d'augmenter leur cytotoxicité, leur prolifération et la sécrétion d'IFN γ (Markiewicz et al., 2005). La prédominance des cellules sécrétrices d'IFN γ ou d'IL17 influence la localisation des lésions en EAE (moelle épinière vs cerveau) (Pierson et al., 2012). Les cellules exprimant un haut taux d'IFN γ , donc ayant un profil Th1/Tc1 sont capables d'infiltrer massivement la moelle épinière et d'induire les symptômes classiques de l'EAE (Stromnes et al., 2008). Les LT exprimant NKG2D, après leur interaction avec MULT1 soluble au niveau du LCS, seraient donc plus cytotoxiques et pourraient infiltrer en grand nombre la moelle épinière et induire des lésions.

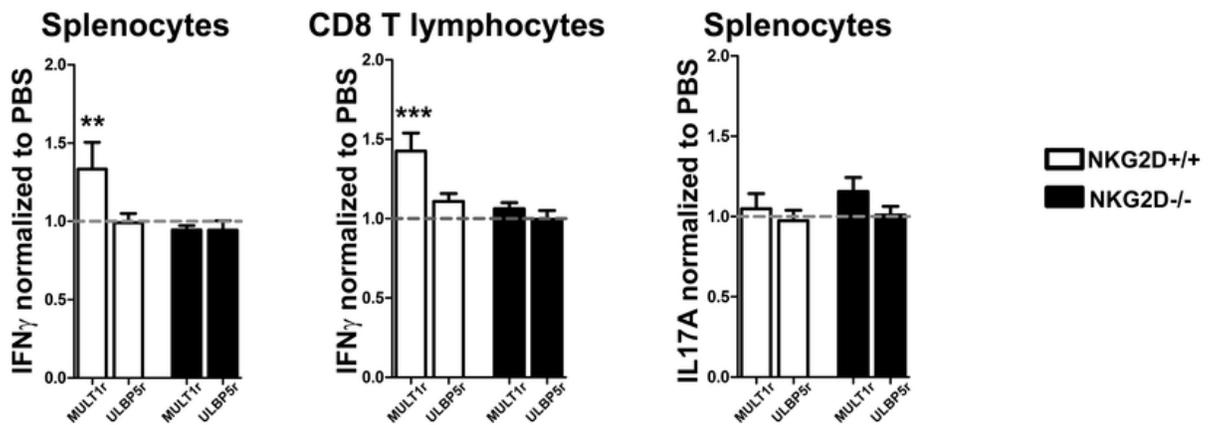


Figure 10 : MULT1 soluble augmente la sécrétion d'IFN γ . Cellules provenant de souris sauvages ou déficientes pour NKG2D mises en culture 5 jours avec de l'anti-CD3, de l'anti-CD25, de l'IL2 et le complexe IL15-IL15R α . Au 2^{ème} jour, les protéines recombinantes MULT1 ou ULBP5 (témoin) ou du PBS sont ajoutés au milieu de culture. Les surnagants sont récoltés au 5^{ème} jour et les sécrétions d'IFN γ et d'IL17 sont déterminées par ELISA. Les résultats sont normalisés pour chaque souris par rapport au PBS représenté par la barre en pointillé à 1. n entre 4 (Klrk1 ^{-/-}) et 15 (Klrk1 ^{+/+}). ** p<0.01 *** p<0.001

2.2.3 Rôle de MULT1 et perspectives

Nous avons donc vu que l'expression de MULT1 est augmentée au pic de l'EAE à la fois sous sa forme entière potentiellement transmembranaire et sa forme soluble. MULT1 pourrait donc avoir deux rôles:

- Les cellules exprimant MULT1 pourraient être susceptibles d'être éliminées par les cellules immunitaires exprimant NKG2D.
- MULT1 soluble pourrait booster les fonctions effectrices des cellules immunitaires qui seraient alors capables d'induire de plus grands dommages dans le SNC.

Il serait intéressant de compléter nos résultats chez la souris par une analyse plus poussée de l'impact *in vivo* de MULT1. Par rapport à nos résultats et ceux d'autres équipes, il est plus intéressant d'utiliser notre modèle passif que le modèle actif pour étudier le rôle de MULT1 (Fig. 1, 6 et 7 de l'article) (Guerra et al., 2013; Ruck et al., 2013)

Pour explorer spécifiquement l'impact de MULT1 soluble, nous pourrions injecter la protéine soluble dans le LCS des ventricules latéraux à partir du début des symptômes d'une EAE passive sous-optimale chez des souris donneuses et receveuses sauvages. Il est important que l'EAE soit sous-optimale pour avoir une marge de progression dans la gravité de la maladie. Si MULT1 soluble potentialise bien *in vivo* les capacités effectrices des LT, l'EAE devrait être plus sévère.

Pour explorer l'impact des deux formes de MULT1, nous pourrions utiliser un anticorps bloquant anti-MULT1 en prophylaxie et en thérapeutique en EAE passive avec des souris donneuses et receveuses sauvages. En outre, l'expérience devrait donner plus de résultats en prophylaxie puisque le groupe du Dr. Wiendl a montré que le NKG2D soluble ne protège pas contre l'EAE active lorsqu'il est administré en thérapie (Ruck et al., 2013). Le début de l'EAE devrait être décalé et/ou les souris devraient avoir des scores cliniques plus faibles. Il serait également intéressant de développer un modèle de souris déficientes pour MULT1. Je ne pense pas que les souris déficientes seraient moins malades que les souris sauvages pour les mêmes raisons que les souris déficientes pour NKG2D ont le même profil de maladie que les souris sauvages. Par contre, nous pourrions utiliser ces souris pour faire le même type d'expérience d'EAE passive que celle faite avec les souris déficientes pour NKG2D. Autrement dit, nous pourrions transférer des splénocytes réactivés provenant de souris sauvages chez des souris sauvages ou déficientes pour MULT1. Les scores cliniques devraient être similaires à ceux de mon expérience de transfert des souris sauvages et déficientes pour NKG2D. Les souris déficientes pour MULT1 devraient être moins sévèrement malades que les souris sauvages. Si les profils sont similaires, cette expérience

confirmerait que MULT1 est le ligand qui intervient dans le développement de l'EAE. Si la sévérité de la maladie des souris receveuses déficientes pour MULT1 se trouve entre les souris receveuses sauvages et les souris receveuses déficientes pour NKG2D, alors c'est que d'autres ligands de NKG2D interviennent dans la progression de la maladie.

En outre, l'utilisation d'anticorps bloquant anti-NKG2D est protecteur dans d'autres modèles animaux de maladies auto-immunes ou inflammatoires que l'EAE comme les modèles du diabète de type 1, d'arthrite ou de colite (Andersson et al., 2011; Ito et al., 2008; Kjellev et al., 2007; Ogasawara et al., 2004; Van Belle et al., 2013). Il serait pertinent de déterminer si dans ces modèles, l'expression d'un ligand spécifique de NKG2D est augmentée et clivée au cours de la progression de la maladie et si le bloquer serait également protecteur. Il serait intéressant de déterminer si l'expression de MULT1 et son clivage sont induits dans toutes les maladies auto-immunes ou inflammatoires ou si chacune de ces maladies ont un profil d'expression de ligands différents.

Les oligodendrocytes murins en culture primaire expriment le MULT1 et d'autant plus après avoir été mis en présence de cytokines inflammatoires (l'IFN γ et le TNF α) pendant 24h (Ruck et al., 2013). En co-culture avec les LT CD4, la fréquence d'oligodendrocytes apoptotiques est diminuée grâce à l'ajout d'anticorps bloquant anti-NKG2D (Ruck et al., 2013). Par contre, aucun résultat ex-vivo sur les souris EAE n'a été rapporté. Par conséquent, il aurait été intéressant d'analyser quels types cellulaires expriment MULT1 dans les lésions d'EAE et donc de déterminer ou confirmer quelles cellules sont susceptibles d'être tuées suite à l'interaction NKG2D-MULT1. Malheureusement, nous n'avons pas réussi à obtenir de marquage satisfaisant de MULT1 en immunofluorescence. Nous avons essayé tous les clones d'anticorps disponibles commercialement ainsi qu'un anticorps développé et envoyé par le laboratoire du Dr. Jonjic en Croatie dans plusieurs conditions. Notre hypothèse est que nous n'avons pas de matériel permettant de détecter efficacement MULT1 en immunofluorescence ou que l'expression de cette protéine sur les cellules est trop faible et diffuse pour être analysable par l'immunofluorescence. En outre, à ma connaissance, aucune étude n'a montré de résultats d'immunofluorescence pour la détection de MULT1 sur tissu. Comme expliqué dans la section 1.1 de ce chapitre, la cytométrie de flux classique ne nous a pas permis non plus d'avoir de résultats concluant. Nous pourrions utiliser la méthode de PrimeFlow RNA

Assay qui permet de détecter simultanément l'ARN et les protéines (aussi bien intracellulaire que de surface) en cytométrie de flux. Cette technique nous permettrait de contourner nos problèmes d'anticorps disponibles limités et/ou d'expression trop faible de la forme pleine de MULT1 pour être détectable par les méthodes que nous avons utilisées. Nous pourrions déterminer si ce ligand est exprimé *ex vivo* sur les neurones, les oligodendrocytes, les microglies ou sur d'autres cellules du SNC comme les astrocytes ou les cellules endothéliales.

Des études précédentes chez les patients atteints de la SEP, dont une menée dans notre laboratoire, ont montré que les ligands de NKG2D MICA/MICB sont exprimés sur les oligodendrocytes, les neurones et les astrocytes (Fernandez-Morera et al., 2008a; Saikali et al., 2007). Les immunofluorescences de l'équipe du Dr Lopez-Larrea montrant une co-localisation entre les MICs et les neurones ou les astrocytes ne correspondent pas à ce qu'on pourrait espérer en termes de qualité de marquage. Notamment, le marquage des astrocytes, normalement robuste présente beaucoup de bruits de fond. Nous avons prouvé, dans le laboratoire, que les oligodendrocytes humains en culture primaire expriment également les ligands de NKG2D MICA/MICB mais aussi les ligands ULBP1, ULBP2 et ULBP3. Bloquer l'interaction NKG2D-NKG2DL protège les oligodendrocytes humains de leur élimination causée par les cellules NK, les LT $\gamma\delta$ ou les LT CD8 activés (Saikali et al., 2007). Des expériences dans le laboratoire, menées par Ana Carmena Moratalla sont en cours pour analyser l'expression des ligands de NKG2D dans les lésions de patients atteints de la SEP et sur des cellules neurales en culture primaire. Les premières expériences ont mis en évidence que les astrocytes dans les sections de patients atteints de SEP et ceux en culture primaire expriment le ligand ULBP4 (données non montrées). Il serait intéressant de vérifier si de ligand de NKG2D est spécifiquement plus augmenté que les autres dans les lésions de patients atteints de la SEP comme l'est MULT1 dans l'EAE. Elle poursuit également des expériences de mort de cellules neurales humaines engendrée par les LT CD8 (données non montrées). De plus, au regard de nos résultats sur MULT1 soluble, il serait intéressant d'aller explorer le LCS de patients atteints de la SEP et de déterminer si des ligands de NKG2D solubles s'y trouvent. Il faudrait alors analyser l'impact de ces ligands solubles sur les LT humains. Si chez l'humain, des ligands solubles potentialisent les fonctions effectrices des LT comme MULT1

chez les souris, bloquer le clivage des ligands (MMP) pourrait limiter le développement de la SEP.

2.3 Implication de NKG2D et ses ligands dans la SEP et traitement

Pour résumer, nos principaux résultats sont:

- Que le ligand de NKG2D, MULT1, est augmenté au pic de l'EAE dans la moelle épinière et le LCS des souris sauvages et déficientes pour NKG2D ;
- Que MULT1 est retrouvé sous sa forme pleine et clivée. La forme soluble de MULT1 est 4.5 fois plus exprimée que la forme entière dans la moelle épinière et 7 fois plus dans le LCS des souris sauvages et déficientes pour NKG2D ;
- Que MULT1 soluble augmente la sécrétion d'IFN γ par les splénocytes et les LT CD8 murins ;
- Que les souris sauvages présentent une EAE plus sévère que les souris déficientes pour NKG2D après transfert de splénocytes ré-activés.

Mon projet de doctorat a permis pour la première fois de mettre en évidence une spécificité d'induction d'un ligand de NKG2D dans l'EAE et de fournir une explication fonctionnelle aux ligands solubles dans une maladie auto-immune.

De plus, les principaux résultats connus chez l'humain sont:

- Que des cellules neurales, plus particulièrement les oligodendrocytes, les neurones et les astrocytes expriment les NKG2DL dans les lésions de SEP (Fernandez-Morera et al., 2008a; Saikali et al., 2007) ;
- Que des LT CD8 sont retrouvés à proximité de certaines de ces cellules exprimant des NKG2DL et in vitro ces LT CD8 sont capables de détruire les oligodendrocytes exprimant les ligands (Saikali et al., 2007) ;
- Que les NKG2DL solubles sont augmentés dans le sérum au cours de la maladie (Fernandez-Morera et al., 2008a) ;
- Que les LT CD4 exprimant NKG2D sont pro-inflammatoires avec des capacités migratoires augmentées (Ruck et al., 2013).

Ainsi nous pouvons supposer à la lumière de mes résultats et de la littérature chez l'humain le mécanisme pathologique faisant intervenir NKG2D et ses ligands ci après. L'inflammation induirait l'expression de certains ligands spécifiques de NKG2D sur les cellules neurales qui peuvent alors être ciblés par les cellules immunitaires exprimant NKG2D et détruites. Au niveau des astrocytes l'interaction NKG2D-NKG2DL pourrait avoir un impact sur la perméabilité de la BHE. D'autres part, les métalloprotéases augmentées au cours de la SEP pourrait cliver les NKG2DL augmentant le taux de ligands solubles dans les liquides biologiques tel que le sérum ou le LCR mais aussi dans le parenchyme cérébral. Les ligands solubles augmenteraient les propriétés effectrices des lymphocytes autrement dit leur capacité pro-inflammatoires, cytotoxiques ou encore leur capacité à infiltrer le SNC pour induire des dommages tissulaires. L'interaction NKG2D-NKG2DL participerait donc à la progression de la SEP de 2 manières, en activant les cellules immunitaires et en permettant directement la destruction des cellules neurales. J'ai repris le schéma de la pathogénèse de la SEP publié dans la revue dont je suis la première auteure que j'ai complété avec le potentiel rôle de NKG2D et ses ligands (Fig. 11).

Ceci va dans le sens de notre hypothèse de départ à savoir que l'interaction entre NKG2D et ses ligands contribue au développement de la SEP et pourrait être une cible thérapeutique intéressante. L'expérience d'EAE passive montre clairement que l'absence de NKG2D est protectrice vis-à-vis de la progression de la maladie. Par conséquent, si on extrapole nos résultats à l'humain, bloquer NKG2D ou ses ligands pourrait être une bonne stratégie thérapeutique pour la SEP. Bloquer NKG2D avec un anticorps monoclonal a été testé chez des patients ayant la maladie de Crohn, l'activité de la maladie était significativement réduite 12 semaines après injection sous-cutanée d'une seule dose de 2mg/kg (Allez et al., 2017). Cette étude montre la faisabilité de l'approche et est prometteuse pour soigner la maladie de Crohn mais aussi d'autres maladies inflammatoires ou auto-immunes. Cependant, NKG2D intervient dans la prévention des maladies infectieuses et des cancers, une expression insuffisante de cette voie est liée à la propagation d'infections ou de métastases. Par conséquent et en rapport avec nos résultats, bloquer l'équivalent de MULT1 chez l'humain me paraît une meilleure option. En effet, les ligands de NKG2D étant nombreux, en bloquer seulement un, pourrait rester sécuritaire vis-à-vis du développement de cancers ou d'infections

tout en étant efficace contre le développement de la maladie. Comme détaillé dans l'introduction, les ligands induits diffèrent suivant le type cellulaire et le type de stress (Gasser et al., 2005; Hamerman et al., 2004; Lin et al., 2012; Nachmani et al., 2009; Raulet et al., 2013; Stern-Ginossar et al., 2008; Textor et al., 2011). Donc la voie de signalisation NKG2D-MULT1 pourrait être la voie principale et délétère impliquée dans le développement de maladies auto-immunes mais moins importante pour la protection contre d'autres pathologies.

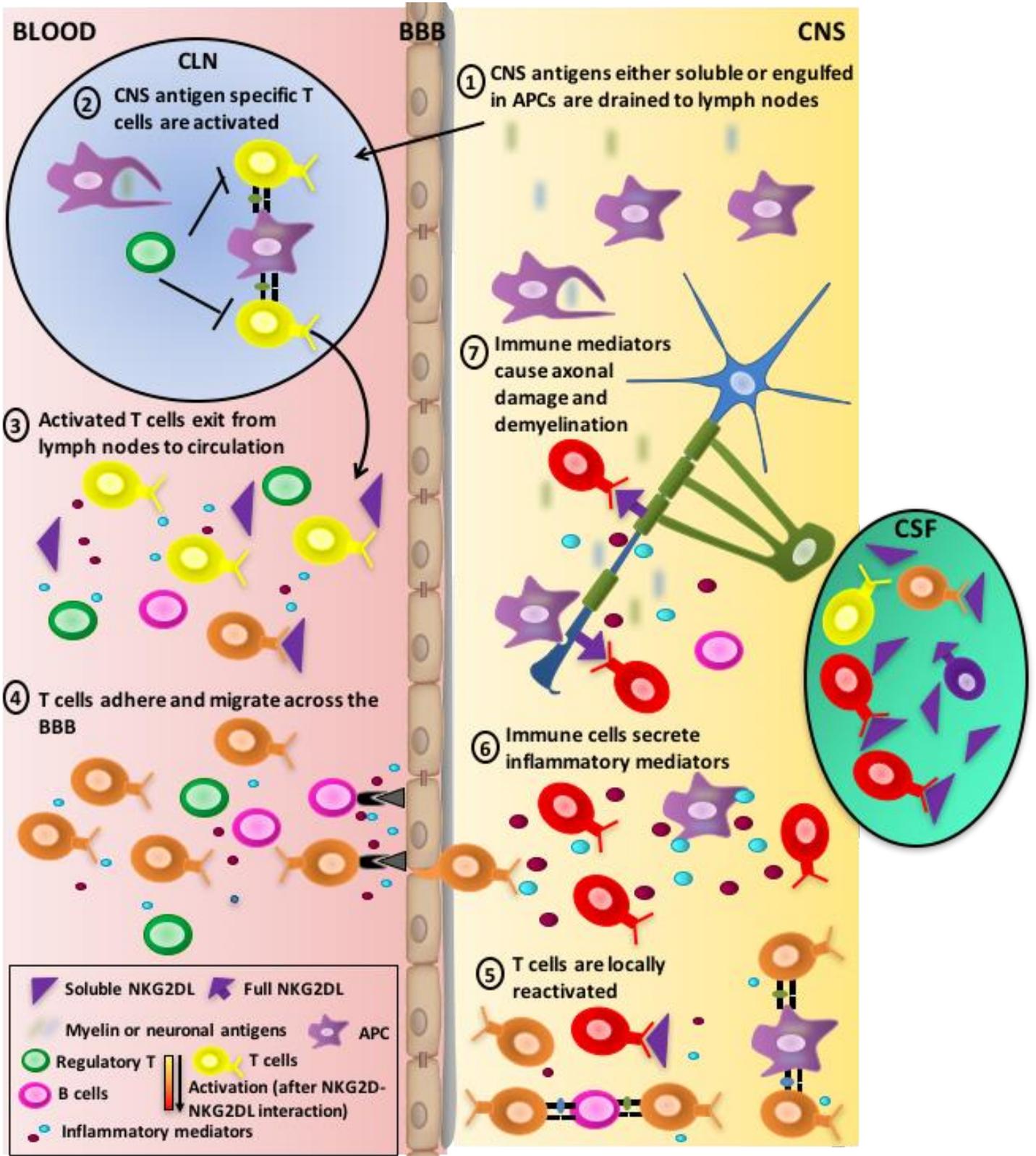


Figure 11 : Schéma illustrant l'implication potentielle de NKG2D et ses ligands dans la SEP. Adapté de Legroux et al., 2015 J Neuroimmune Pharmacol.

Bibliographie

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

Ackerman, A.L., and Cresswell, P. (2004). Cellular mechanisms governing cross-presentation of exogenous antigens. *Nat Immunol* 5, 678-684.

Albert, M., Antel, J., Bruck, W., and Stadelmann, C. (2007). Extensive cortical remyelination in patients with chronic multiple sclerosis. *Brain Pathol* 17, 129-138.

Alcina, A., Abad-Grau Mdel, M., Fedetz, M., Izquierdo, G., Lucas, M., Fernandez, O., Ndagire, D., Catala-Rabasa, A., Ruiz, A., Gayan, J., *et al.* (2012). Multiple sclerosis risk variant HLA-DRB1*1501 associates with high expression of DRB1 gene in different human populations. *PLoS One* 7, e29819.

Allaman, I., Belanger, M., and Magistretti, P.J. (2011). Astrocyte-neuron metabolic relationships: for better and for worse. *Trends Neurosci* 34, 76-87.

Allegretta, M., Nicklas, J.A., Sriram, S., and Albertini, R.J. (1990). T cells responsive to myelin basic protein in patients with multiple sclerosis. *Science* 247, 718-721.

Allen, S.J., Baker, D., O'Neill, J.K., Davison, A.N., and Turk, J.L. (1993). Isolation and characterization of cells infiltrating the spinal cord during the course of chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis in the Biozzi AB/H mouse. *Cellular immunology* 146, 335-350.

Allez, M., Skolnick, B.E., Wisniewska-Jarosinska, M., Petryka, R., and Overgaard, R.V. (2017). Anti-NKG2D monoclonal antibody (NNC0142-0002) in active Crohn's disease: a randomised controlled trial. *Gut* 66, 1918-1925.

Allez, M., Tieng, V., Nakazawa, A., Treton, X., Pacault, V., Dulphy, N., Caillat-Zucman, S., Paul, P., Gornet, J.M., Douay, C., *et al.* (2007). CD4+NKG2D+ T cells in Crohn's disease mediate inflammatory and cytotoxic responses through MICA interactions. *Gastroenterology* 132, 2346-2358.

Almolda, B., Gonzalez, B., and Castellano, B. (2010). Activated microglial cells acquire an immature dendritic cell phenotype and may terminate the immune response in an acute model of EAE. *J Neuroimmunol* 223, 39-54.

Almolda, B., Gonzalez, B., and Castellano, B. (2011). Antigen presentation in EAE: role of microglia, macrophages and dendritic cells. *Front Biosci (Landmark Ed)* 16, 1157-1171.

Aloisi, F., Penna, G., Polazzi, E., Minghetti, L., and Adorini, L. (1999). CD40-CD154 interaction and IFN-gamma are required for IL-12 but not prostaglandin E2 secretion by microglia during antigen presentation to Th1 cells. *J Immunol* 162, 1384-1391.

Andersson, A.K., Sumariwalla, P.F., McCann, F.E., Amjadi, P., Chang, C., McNamee, K., Tornehave, D., Haase, C., Ageroso, H., Stennicke, V.W., *et al.* (2011). Blockade of NKG2D ameliorates disease in mice with collagen-induced arthritis: a potential pathogenic role in chronic inflammatory arthritis. *Arthritis Rheum* 63, 2617-2629.

Anderton, S.M., Kissler, S., Lamont, A.G., and Wraith, D.C. (1999). Therapeutic potential of TCR antagonists is determined by their ability to modulate a diverse repertoire of autoreactive T cells. *Eur J Immunol* 29, 1850-1857.

Annibaldi, V., Ristori, G., Angelini, D.F., Serafini, B., Mechelli, R., Cannoni, S., Romano, S., Paolillo, A., Abderrahim, H., Diamantini, A., *et al.* (2011). CD161(high)CD8+T cells bear pathogenetic potential in multiple sclerosis. *Brain* 134, 542-554.

Antel, J., Brown, M., Nicholas, M.K., Blain, M., Noronha, A., and Reder, A. (1988). Activated suppressor cell function in multiple sclerosis--clinical correlations. *J Neuroimmunol* 17, 323-330.

Antel, J.P., Bania, M.B., Reder, A., and Cashman, N. (1986). Activated suppressor cell dysfunction in progressive multiple sclerosis. *J Immunol* 137, 137-141.

Antoun, A., Jobson, S., Cook, M., O'Callaghan, C.A., Moss, P., and Briggs, D.C. (2010). Single nucleotide polymorphism analysis of the NKG2D ligand cluster on the long arm of chromosome 6: Extensive polymorphisms and evidence of diversity between human populations. *Hum Immunol* 71, 610-620.

Arapovic, J., Lenac, T., Antulov, R., Polic, B., Ruzsics, Z., Carayannopoulos, L.N., Koszinowski, U.H., Krmpotic, A., and Jonjic, S. (2009). Differential susceptibility of RAE-1 isoforms to mouse cytomegalovirus. *J Virol* 83, 8198-8207.

Ashiru, O., Bennett, N.J., Boyle, L.H., Thomas, M., Trowsdale, J., and Wills, M.R. (2009). NKG2D ligand MICA is retained in the cis-Golgi apparatus by human cytomegalovirus protein UL142. *J Virol* 83, 12345-12354.

Aspelund, A., Antila, S., Proulx, S.T., Karlsen, T.V., Karaman, S., Detmar, M., Wiig, H., and Alitalo, K. (2015). A dural lymphatic vascular system that drains brain interstitial fluid and macromolecules. *J Exp Med* 212, 991-999.

Astier, A.L., Meiffren, G., Freeman, S., and Hafler, D.A. (2006). Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Clin Invest* 116, 3252-3257.

Atarashi, K., Tanoue, T., Oshima, K., Suda, W., Nagano, Y., Nishikawa, H., Fukuda, S., Saito, T., Narushima, S., Hase, K., *et al.* (2013). Treg induction by a rationally selected mixture of Clostridia strains from the human microbiota. *Nature* 500, 232-236.

Atarashi, K., Tanoue, T., Shima, T., Imaoka, A., Kuwahara, T., Momose, Y., Cheng, G., Yamasaki, S., Saito, T., Ohba, Y., *et al.* (2011). Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* 331, 337-341.

Awasthi, A., Carrier, Y., Peron, J.P., Bettelli, E., Kamanaka, M., Flavell, R.A., Kuchroo, V.K., Oukka, M., and Weiner, H.L. (2007). A dominant function for interleukin 27 in generating interleukin 10-producing anti-inflammatory T cells. *Nat Immunol* 8, 1380-1389.

Axtell, R.C., de Jong, B.A., Boniface, K., van der Voort, L.F., Bhat, R., De Sarno, P., Naves, R., Han, M., Zhong, F., Castellanos, J.G., *et al.* (2010). T helper type 1 and 17 cells determine efficacy of interferon-beta in multiple sclerosis and experimental encephalomyelitis. *Nat Med* 16, 406-412.

Axtell, R.C., Raman, C., and Steinman, L. (2013). Type I interferons: beneficial in Th1 and detrimental in Th17 autoimmunity. *Clin Rev Allergy Immunol* 44, 114-120.

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

Backstrom, E., Chambers, B.J., Ho, E.L., Naidenko, O.V., Mariotti, R., Fremont, D.H., Yokoyama, W.M., Kristensson, K., and Ljunggren, H.G. (2003). Natural killer cell-mediated lysis of dorsal root ganglia neurons via RAE1/NKG2D interactions. *Eur J Immunol* 33, 92-100.

Baecher-Allan, C., Kaskow, B.J., and Weiner, H.L. (2018). Multiple Sclerosis: Mechanisms and Immunotherapy. *Neuron* 97, 742-768.

Baecher-Allan, C.M., Costantino, C.M., Cvetanovich, G.L., Ashley, C.W., Berioux, G., Dominguez-Villar, M., and Hafler, D.A. (2011). CD2 costimulation reveals defective activity by human CD4+CD25(hi) regulatory cells in patients with multiple sclerosis. *J Immunol* 186, 3317-3326.

Bahram, S., Mizuki, N., Inoko, H., and Spies, T. (1996a). Nucleotide sequence of the human MHC class I MICA gene. *Immunogenetics* 44, 80-81.

Bahram, S., Shiina, T., Oka, A., Tamiya, G., and Inoko, H. (1996b). Genomic structure of the human MHC class I MICB gene. *Immunogenetics* 45, 161-162.

Barrat, F.J., Cua, D.J., Boonstra, A., Richards, D.F., Crain, C., Savelkoul, H.F., de Waal-Malefyt, R., Coffman, R.L., Hawrylowicz, C.M., and O'Garra, A. (2002). In vitro generation of interleukin 10-producing regulatory CD4(+) T cells is induced by immunosuppressive drugs and inhibited by T helper type 1 (Th1)- and Th2-inducing cytokines. *J Exp Med* 195, 603-616.

Bartholomaeus, I., Kawakami, N., Odoardi, F., Schlager, C., Miljkovic, D., Ellwart, J.W., Klinkert, W.E., Flugel-Koch, C., Issekutz, T.B., Wekerle, H., *et al.* (2009). Effector T cell interactions with meningeal vascular structures in nascent autoimmune CNS lesions. *Nature* 462, 94-98.

Bartzokis, G., Lu, P.H., Heydari, P., Couvrette, A., Lee, G.J., Kalashyan, G., Freeman, F., Grinstead, J.W., Villablanca, P., Finn, J.P., *et al.* (2012). Multimodal magnetic resonance imaging assessment of white matter aging trajectories over the lifespan of healthy individuals. *Biol Psychiatry* 72, 1026-1034.

Basar, E., and Guntekin, B. (2008). A review of brain oscillations in cognitive disorders and the role of neurotransmitters. *Brain Res* 1235, 172-193.

Batista, F.D., and Harwood, N.E. (2009). The who, how and where of antigen presentation to B cells. *Nat Rev Immunol* 9, 15-27.

Bauer, S., Groh, V., Wu, J., Steinle, A., Phillips, J.H., Lanier, L.L., and Spies, T. (1999). Activation of NK cells and T cells by NKG2D, a receptor for stress-inducible MICA. *Science* 285, 727-729.

Baughman, E.J., Mendoza, J.P., Ortega, S.B., Ayers, C.L., Greenberg, B.M., Frohman, E.M., and Karandikar, N.J. (2011). Neuroantigen-specific CD8+ regulatory T-cell function is deficient during acute exacerbation of multiple sclerosis. *J Autoimmun* 36, 115-124.

Baxter, A.G. (2007). The origin and application of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Nat Rev Immunol* 7, 904-912.

Bean, B.P. (2007). The action potential in mammalian central neurons. *Nat Rev Neurosci* 8, 451-465.

Behrens, F., Tak, P.P., Ostergaard, M., Stoilov, R., Wiland, P., Huizinga, T.W., Berenfus, V.Y., Vladeva, S., Rech, J., Rubbert-Roth, A., *et al.* (2014). MOR103, a human monoclonal antibody to granulocyte-macrophage colony-stimulating factor, in the treatment of patients with moderate rheumatoid arthritis: results of a phase Ib/IIa randomised, double-blind, placebo-controlled, dose-escalation trial. *Ann Rheum Dis* doi: 10.1136/annrheumdis-2013-204816.

Bellon, T., Heredia, A.B., Llano, M., Minguela, A., Rodriguez, A., Lopez-Botet, M., and Aparicio, P. (1999). Triggering of effector functions on a CD8⁺ T cell clone upon the aggregation of an activatory CD94/kp39 heterodimer. *J Immunol* 162, 3996-4002.

Ben Haim, L., and Rowitch, D.H. (2017). Functional diversity of astrocytes in neural circuit regulation. *Nat Rev Neurosci* 18, 31-41.

Berer, K., and Krishnamoorthy, G. (2014). Microbial view of central nervous system autoimmunity. *FEBS Lett* 588, 4207-4213.

Berer, K., Mues, M., Koutrolos, M., Rasbi, Z.A., Boziki, M., Johner, C., Wekerle, H., and Krishnamoorthy, G. (2011). Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature* 479, 538-541.

Berghmans, N., Heremans, H., Li, S., Martens, E., Matthys, P., Sorokin, L., Van Damme, J., and Opdenakker, G. (2012). Rescue from acute neuroinflammation by pharmacological chemokine-mediated deviation of leukocytes. *Journal of neuroinflammation* 9, 243.

Berthelot, L., Laplaud, D.A., Pettre, S., Ballet, C., Michel, L., Hillion, S., Braudeau, C., Connan, F., Lefrere, F., Wiertlewski, S., *et al.* (2008). Blood CD8⁺ T cell responses against myelin determinants in multiple sclerosis and healthy individuals. *Eur J Immunol* 38, 1889-1899.

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

Bhargava, P., and Mowry, E.M. (2014). Gut microbiome and multiple sclerosis. *Curr Neurol Neurosci Rep* 14, 492.

Bielekova, B., Goodwin, B., Richert, N., Cortese, I., Kondo, T., Afshar, G., Gran, B., Eaton, J., Antel, J., Frank, J.A., *et al.* (2000). Encephalitogenic potential of the myelin basic protein peptide (amino acids 83-99) in multiple sclerosis: results of a phase II clinical trial with an altered peptide ligand. *Nat Med* 6, 1167-1175.

- Bielekova, B., Sung, M.H., Kadom, N., Simon, R., McFarland, H., and Martin, R. (2004). Expansion and functional relevance of high-avidity myelin-specific CD4+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* *172*, 3893-3904.
- Bin Dhuban, K., d'Hennezel, E., Nashi, E., Bar-Or, A., Rieder, S., Shevach, E.M., Nagata, S., and Piccirillo, C.A. (2015). Coexpression of TIGIT and FCRL3 Identifies Helios+ Human Memory Regulatory T Cells. *J Immunol* *194*, 3687-3696.
- 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*, 1174-1183.
- Blakemore, W.F., and Franklin, R.J. (2008). Remyelination in experimental models of toxin-induced demyelination. *Curr Top Microbiol Immunol* *318*, 193-212.
- Bokori-Brown, M., Savva, C.G., Fernandes da Costa, S.P., Naylor, C.E., Basak, A.K., and Titball, R.W. (2011). Molecular basis of toxicity of *Clostridium perfringens* epsilon toxin. *FEBS J* *278*, 4589-4601.
- Bomprezzi, R. (2015). Dimethyl fumarate in the treatment of relapsing-remitting multiple sclerosis: an overview. *Ther Adv Neurol Disord* *8*, 20-30.
- Borrego, F., Masilamani, M., Kabat, J., Sanni, T.B., and Coligan, J.E. (2005). The cell biology of the human natural killer cell CD94/NKG2A inhibitory receptor. *Mol Immunol* *42*, 485-488.
- Borrego, F., Masilamani, M., Marusina, A.I., Tang, X., and Coligan, J.E. (2006). The CD94/NKG2 family of receptors: from molecules and cells to clinical relevance. *Immunol Res* *35*, 263-278.
- Bouillet, P., Purton, J.F., Godfrey, D.I., Zhang, L.C., Coultas, L., Puthalakath, H., Pellegrini, M., Cory, S., Adams, J.M., and Strasser, A. (2002). BH3-only Bcl-2 family member Bim is required for apoptosis of autoreactive thymocytes. *Nature* *415*, 922-926.
- Boziki, M., and Grigoriadis, N. (2018). An Update on the Role of Matrix Metalloproteinases in the Pathogenesis of Multiple Sclerosis. *Med Chem* *14*, 155-169.
- Brewer, G.J. (1997). Isolation and culture of adult rat hippocampal neurons. *Journal of neuroscience methods* *71*, 143-155.
- Brewer, G.J., and Torricelli, J.R. (2007). Isolation and culture of adult neurons and neurospheres. *Nature protocols* *2*, 1490-1498.

Bryceson, Y.T., March, M.E., Ljunggren, H.G., and Long, E.O. (2006). Synergy among receptors on resting NK cells for the activation of natural cytotoxicity and cytokine secretion. *Blood* 107, 159-166.

Brynedal, B., Duvefelt, K., Jonasdottir, G., Roos, I.M., Akesson, E., Palmgren, J., and Hillert, J. (2007). HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis. *PLoS ONE* 2, e664.

Brzostek, J., Gascoigne, N.R., and Rybakin, V. (2016). Cell Type-Specific Regulation of Immunological Synapse Dynamics by B7 Ligand Recognition. *Front Immunol* 7, 24.

Bsibsi, M., Peferoen, L.A., Holtman, I.R., Nacken, P.J., Gerritsen, W.H., Witte, M.E., van Horssen, J., Eggen, B.J., van der Valk, P., Amor, S., *et al.* (2014). Demyelination during multiple sclerosis is associated with combined activation of microglia/macrophages by IFN-gamma and alpha B-crystallin. *Acta Neuropathol* 128, 215-229.

Burgess, S.J., Marusina, A.I., Pathmanathan, I., Borrego, F., and Coligan, J.E. (2006). IL-21 down-regulates NKG2D/DAP10 expression on human NK and CD8+ T cells. *J Immunol* 176, 1490-1497.

Calvo-Barreiro, L., Eixarch, H., Montalban, X., and Espejo, C. (2018). Combined therapies to treat complex diseases: The role of the gut microbiota in multiple sclerosis. *Autoimmun Rev* 17, 165-174.

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

Campanella, M., Sciorati, C., Tarozzo, G., and Beltramo, M. (2002). Flow cytometric analysis of inflammatory cells in ischemic rat brain. *Stroke; a journal of cerebral circulation* 33, 586-592.

Cao, L., Beaulac, H., and Eurich, A. (2012). Differential lumbar spinal cord responses among wild type, CD4 knockout, and CD40 knockout mice in spinal nerve L5 transection-induced neuropathic pain. *Molecular pain* 8, 88.

Cao, W., Xi, X., Hao, Z., Li, W., Kong, Y., Cui, L., Ma, C., Ba, D., and He, W. (2007). RAET1E2, a soluble isoform of the UL16-binding protein RAET1E produced by tumor cells, inhibits NKG2D-mediated NK cytotoxicity. *J Biol Chem* 282, 18922-18928.

Carapito, R., and Bahram, S. (2015). Genetics, genomics, and evolutionary biology of NKG2D ligands. *Immunol Rev* 267, 88-116.

- Carayannopoulos, L.N., Naidenko, O.V., Fremont, D.H., and Yokoyama, W.M. (2002a). Cutting edge: murine UL16-binding protein-like transcript 1: a newly described transcript encoding a high-affinity ligand for murine NKG2D. *J Immunol* 169, 4079-4083.
- Carayannopoulos, L.N., Naidenko, O.V., Kinder, J., Ho, E.L., Fremont, D.H., and Yokoyama, W. (2002b). Ligands for murine NKG2D display heterogeneous binding behavior. *Eur J Immunol* 32, 597-605.
- Cardona, A.E., Huang, D., Sasse, M.E., and Ransohoff, R.M. (2006). Isolation of murine microglial cells for RNA analysis or flow cytometry. *Nature protocols* 1, 1947-1951.
- Carrieri, P.B., Provitera, V., De Rosa, T., Tartaglia, G., Gorga, F., and Perrella, O. (1998). Profile of cerebrospinal fluid and serum cytokines in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a correlation with clinical activity. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 20, 373-382.
- Carson, M.J., Reilly, C.R., Sutcliffe, J.G., and Lo, D. (1998). Mature microglia resemble immature antigen-presenting cells. *Glia* 22, 72-85.
- Carson, M.J., Sutcliffe, J.G., and Campbell, I.L. (1999). Microglia stimulate naive T-cell differentiation without stimulating T-cell proliferation. *J Neurosci Res* 55, 127-134.
- Cayrol, R., Wosik, K., Berard, J.L., Dodelet-Devillers, A., Ifergan, I., Kebir, H., Haqqani, A.S., Kreymborg, K., Krug, S., Moudjian, R., *et al.* (2008). Activated leukocyte cell adhesion molecule promotes leukocyte trafficking into the central nervous system. *Nat Immunol* 9, 137-145.
- Chaigne-Delalande, B., Li, F.Y., O'Connor, G.M., Lukacs, M.J., Jiang, P., Zheng, L., Shatzer, A., Biancalana, M., Pittaluga, S., Matthews, H.F., *et al.* (2013). Mg²⁺ regulates cytotoxic functions of NK and CD8 T cells in chronic EBV infection through NKG2D. *Science* 341, 186-191.
- Chamberlain, S.R., Muller, U., Blackwell, A.D., Robbins, T.W., and Sahakian, B.J. (2006). Noradrenergic modulation of working memory and emotional memory in humans. *Psychopharmacology (Berl)* 188, 397-407.
- Chambers, C.A., and Allison, J.P. (1999). CTLA-4--the costimulatory molecule that doesn't: regulation of T-cell responses by inhibition. *Cold Spring Harb Symp Quant Biol* 64, 303-312.
- Chan, J.R., Watkins, T.A., Cosgaya, J.M., Zhang, C., Chen, L., Reichardt, L.F., Shooter, E.M., and Barres, B.A. (2004). NGF controls axonal receptivity to myelination by Schwann cells or oligodendrocytes. *Neuron* 43, 183-191.

- Chappert, P., and Schwartz, R.H. (2010). Induction of T cell anergy: integration of environmental cues and infectious tolerance. *Curr Opin Immunol* 22, 552-559.
- Charles, P., Hernandez, M.P., Stankoff, B., Aigrot, M.S., Colin, C., Rougon, G., Zalc, B., and Lubetzki, C. (2000). Negative regulation of central nervous system myelination by polysialylated-neural cell adhesion molecule. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 7585-7590.
- Chastain, E.M., and Miller, S.D. (2012). Molecular mimicry as an inducing trigger for CNS autoimmune demyelinating disease. *Immunol Rev* 245, 227-238.
- Chatila, T.A., Blaeser, F., Ho, N., Lederman, H.M., Voulgaropoulos, C., Helms, C., and Bowcock, A.M. (2000). JM2, encoding a fork head-related protein, is mutated in X-linked autoimmunity-allergic dysregulation syndrome. *J Clin Invest* 106, R75-81.
- Chen, Y., Langrish, C.L., McKenzie, B., Joyce-Shaikh, B., Stumhofer, J.S., McClanahan, T., Blumenschein, W., Churakovsa, T., Low, J., Presta, L., *et al.* (2006). Anti-IL-23 therapy inhibits multiple inflammatory pathways and ameliorates autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 116, 1317-1326.
- Cheng, W., and Chen, G. (2014). Chemokines and chemokine receptors in multiple sclerosis. *Mediators Inflamm* 2014, 659206.
- Chiarini, M., Serana, F., Zanotti, C., Capra, R., Rasia, S., Rottoli, M., Rovaris, M., Caputo, D., Cavaletti, G., Frigo, M., *et al.* (2012). Modulation of the central memory and Tr1-like regulatory T cells in multiple sclerosis patients responsive to interferon-beta therapy. *Mult Scler* 18, 788-798.
- Chinta, S.J., and Andersen, J.K. (2005). Dopaminergic neurons. *Int J Biochem Cell Biol* 37, 942-946.
- Chitadze, G., Bhat, J., Lettau, M., Janssen, O., and Kabelitz, D. (2013). Generation of soluble NKG2D ligands: proteolytic cleavage, exosome secretion and functional implications. *Scand J Immunol* 78, 120-129.
- Chou, Y.K., Bourdette, D.N., Offner, H., Whitham, R., Wang, R.Y., Hashim, G.A., and Vandenberg, A.A. (1992). Frequency of T cells specific for myelin basic protein and myelin proteolipid protein in blood and cerebrospinal fluid in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 38, 105-113.
- Chung, W.S., Allen, N.J., and Eroglu, C. (2015a). Astrocytes Control Synapse Formation, Function, and Elimination. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 7, a020370.

Chung, W.S., Welsh, C.A., Barres, B.A., and Stevens, B. (2015b). Do glia drive synaptic and cognitive impairment in disease? *Nat Neurosci* *18*, 1539-1545.

Clifford, D.B., De Luca, A., Simpson, D.M., Arendt, G., Giovannoni, G., and Nath, A. (2010). Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet Neurol* *9*, 438-446.

Codarri, L., Greter, M., and Becher, B. (2013). Communication between pathogenic T cells and myeloid cells in neuroinflammatory disease. *Trends Immunol* *34*, 114-119.

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

Cohen, P.L., and Eisenberg, R.A. (1991). Lpr and gld: single gene models of systemic autoimmunity and lymphoproliferative disease. *Annu Rev Immunol* *9*, 243-269.

Colonna, M., and Wang, Y. (2016). TREM2 variants: new keys to decipher Alzheimer disease pathogenesis. *Nat Rev Neurosci* *17*, 201-207.

Confavreux, C., and Vukusic, S. (2006). Age at disability milestones in multiple sclerosis. *Brain* *129*, 595-605.

Constantinescu, C.S., Farooqi, N., O'Brien, K., and Gran, B. (2011). Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) as a model for multiple sclerosis (MS). *Br J Pharmacol* *164*, 1079-1106.

Constantinescu, C.S., Hilliard, B., Ventura, E., Wysocka, M., Showe, L., Lavi, E., Fujioka, T., Scott, P., Trinchieri, G., and Rostami, A. (2001). Modulation of susceptibility and resistance to an autoimmune model of multiple sclerosis in prototypically susceptible and resistant strains by neutralization of interleukin-12 and interleukin-4, respectively. *Clin Immunol* *98*, 23-30.

Cooper, M.D., and Alder, M.N. (2006). The evolution of adaptive immune systems. *Cell* *124*, 815-822.

Correale, J., and Farez, M. (2007). Association between parasite infection and immune responses in multiple sclerosis. *Ann Neurol* *61*, 97-108.

Correale, J., and Farez, M.F. (2011). The impact of parasite infections on the course of multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* *233*, 6-11.

Correale, J., and Villa, A. (2008). Isolation and characterization of CD8⁺ regulatory T cells in multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 195, 121-134.

Corthay, A. (2006). A three-cell model for activation of naive T helper cells. *Scand J Immunol* 64, 93-96.

Corthay, A. (2009). How do regulatory T cells work? *Scand J Immunol* 70, 326-336.

Crane, C.A., Han, S.J., Barry, J.J., Ahn, B.J., Lanier, L.L., and Parsa, A.T. (2010). TGF-beta downregulates the activating receptor NKG2D on NK cells and CD8⁺ T cells in glioma patients. *Neuro Oncol* 12, 7-13.

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., Rucke, M.K., *et al.* (2004). High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8⁺ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay. *Blood* 103, 4222-4231.

Cross, A.H., and Naismith, R.T. (2014). Established and novel disease-modifying treatments in multiple sclerosis. *J Intern Med* 275, 350-363.

Cua, D.J., Sherlock, J., Chen, Y., Murphy, C.A., Joyce, B., Seymour, B., Lucian, L., To, W., Kwan, S., Churakova, T., *et al.* (2003). Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* 421, 744-748.

Cusick, M.F., Libbey, J.E., and Fujinami, R.S. (2012). Molecular mimicry as a mechanism of autoimmune disease. *Clin Rev Allergy Immunol* 42, 102-111.

Dardalhon, V., Korn, T., Kuchroo, V.K., and Anderson, A.C. (2008). Role of Th1 and Th17 cells in organ-specific autoimmunity. *J Autoimmun* 31, 252-256.

Darlington, P.J., Podjaski, C., Horn, K.E., Costantino, S., Blain, M., Saikali, P., Chen, Z., Baker, K.A., Newcombe, J., Freedman, M., *et al.* (2008). Innate immune-mediated neuronal injury consequent to loss of astrocytes. *J Neuropathol Exp Neurol* 67, 590-599.

Das, H., Groh, V., Kuijl, C., Sugita, M., Morita, C.T., Spies, T., and Bukowski, J.F. (2001). MICA engagement by human Vgamma2Vdelta2 T cells enhances their antigen-dependent effector function. *Immunity* 15, 83-93.

Davalos, D., Grutzendler, J., Yang, G., Kim, J.V., Zuo, Y., Jung, S., Littman, D.R., Dustin, M.L., and Gan, W.B. (2005). ATP mediates rapid microglial response to local brain injury in vivo. *Nat Neurosci* 8, 752-758.

Davalos, D., Ryu, J.K., Merlini, M., Baeten, K.M., Le Moan, N., Petersen, M.A., Deerinck, T.J., Smirnoff, D.S., Bedard, C., Hakozaki, H., *et al.* (2012). Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nat Commun* 3, 1227.

Dave, V.P. (2009). Hierarchical role of CD3 chains in thymocyte development. *Immunological reviews* 232, 22-33.

David, L.A., Maurice, C.F., Carmody, R.N., Gootenberg, D.B., Button, J.E., Wolfe, B.E., Ling, A.V., Devlin, A.S., Varma, Y., Fischbach, M.A., *et al.* (2014). Diet rapidly and reproducibly alters the human gut microbiome. *Nature* 505, 559-563.

Davis, K.L., Stewart, D.G., Friedman, J.I., Buchsbaum, M., Harvey, P.D., Hof, P.R., Buxbaum, J., and Haroutunian, V. (2003). White matter changes in schizophrenia: evidence for myelin-related dysfunction. *Arch Gen Psychiatry* 60, 443-456.

de Andres, C., Aristimuno, C., de Las Heras, V., Martinez-Gines, M.L., Bartolome, M., Arroyo, R., Navarro, J., Gimenez-Roldan, S., Fernandez-Cruz, E., and Sanchez-Ramon, S. (2007). Interferon beta-1a therapy enhances CD4+ regulatory T-cell function: an ex vivo and in vitro longitudinal study in relapsing-remitting multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* 182, 204-211.

de Vos, A.F., van Meurs, M., Brok, H.P., Boven, L.A., Hintzen, R.Q., van der Valk, P., Ravid, R., Rensing, S., Boon, L., t Hart, B.A., *et al.* (2002). Transfer of central nervous system autoantigens and presentation in secondary lymphoid organs. *J Immunol* 169, 5415-5423.

Deb, C., and Howe, C.L. (2009). Functional characterization of mouse spinal cord infiltrating CD8+ lymphocytes. *Journal of neuroimmunology* 214, 33-42.

Defrance, T., Taillardet, M., and Genestier, L. (2011). T cell-independent B cell memory. *Curr Opin Immunol* 23, 330-336.

Deng, W., Gowen, B.G., Zhang, L., Wang, L., Lau, S., Iannello, A., Xu, J., Rovis, T.L., Xiong, N., and Raulet, D.H. (2015). Antitumor immunity. A shed NKG2D ligand that promotes natural killer cell activation and tumor rejection. *Science* 348, 136-139.

Denic, A., Johnson, A.J., Bieber, A.J., Warrington, A.E., Rodriguez, M., and Pirko, I. (2011). The relevance of animal models in multiple sclerosis research. *Pathophysiology* 18, 21-29.

Descarries, L., and Mechawar, N. (2000). Ultrastructural evidence for diffuse transmission by monoamine and acetylcholine neurons of the central nervous system. *Prog Brain Res* 125, 27-47.

Deshpande, P., King, I.L., and Segal, B.M. (2007). Cutting edge: CNS CD11c⁺ cells from mice with encephalomyelitis polarize Th17 cells and support CD25⁺CD4⁺ T cell-mediated immunosuppression, suggesting dual roles in the disease process. *J Immunol* 178, 6695-6699.

Dhodapkar, M.V., and Kumar, V. (2017). Type II NKT Cells and Their Emerging Role in Health and Disease. *J Immunol* 198, 1015-1021.

Dick, A.D., Ford, A.L., Forrester, J.V., and Sedgwick, J.D. (1995). Flow cytometric identification of a minority population of MHC class II positive cells in the normal rat retina distinct from CD45^{low}CD11b/c⁺CD4^{low} parenchymal microglia. *The British journal of ophthalmology* 79, 834-840.

Diefenbach, A., Hsia, J.K., Hsiung, M.Y., and Raulet, D.H. (2003). A novel ligand for the NKG2D receptor activates NK cells and macrophages and induces tumor immunity. *Eur J Immunol* 33, 381-391.

Diefenbach, A., Tomasello, E., Lucas, M., Jamieson, A.M., Hsia, J.K., Vivier, E., and Raulet, D.H. (2002). Selective associations with signaling proteins determine stimulatory versus costimulatory activity of NKG2D. *Nat Immunol* 3, 1142-1149.

Ding, Q., Lu, L., Wang, B., Zhou, Y., Jiang, Y., Zhou, X., Xin, L., Jiao, Z., and Chou, K.Y. (2006). B7H1-Ig fusion protein activates the CD4⁺ IFN-gamma receptor⁺ type 1 T regulatory subset through IFN-gamma-secreting Th1 cells. *J Immunol* 177, 3606-3614.

Djelloul, M., Popa, N., Pelletier, F., Raguenez, G., and Boucraut, J. (2016). RAE-1 expression is induced during experimental autoimmune encephalomyelitis and is correlated with microglia cell proliferation. *Brain Behav Immun* 58, 209-217.

Duan, H., Xing, S., Luo, Y., Feng, L., Gramaglia, I., Zhang, Y., Lu, D., Zeng, Q., Fan, K., Feng, J., *et al.* (2013). Targeting endothelial CD146 attenuates neuroinflammation by limiting lymphocyte extravasation to the CNS. *Sci Rep* 3, 1687.

Dumas, A., Amiable, N., de Rivero Vaccari, J.P., Chae, J.J., Keane, R.W., Lacroix, S., and Vallieres, L. (2014). The inflammasome pyrin contributes to pertussis toxin-induced IL-1beta synthesis, neutrophil intravascular crawling and autoimmune encephalomyelitis. *PLoS Pathog* 10, e1004150.

Dunkley, P.R., Jarvie, P.E., and Robinson, P.J. (2008). A rapid Percoll gradient procedure for preparation of synaptosomes. *Nat Protoc* 3, 1718-1728.

Durafourt, B.A., Moore, C.S., Zammit, D.A., Johnson, T.A., Zaguia, F., Guiot, M.C., Bar-Or, A., and Antel, J.P. (2012). Comparison of polarization properties of human adult microglia and blood-derived macrophages. *Glia* 60, 717-727.

Dusseaux, M., Martin, E., Serriari, N., Peguillet, I., Premel, V., Louis, D., Milder, M., Le Bourhis, L., Soudais, C., Treiner, E., *et al.* (2011). Human MAIT cells are xenobiotic-resistant, tissue-targeted, CD161hi IL-17-secreting T cells. *Blood* *117*, 1250-1259.

Dyment, D.A., Ebers, G.C., and Sadovnick, A.D. (2004). Genetics of multiple sclerosis. *Lancet Neurol* *3*, 104-110.

Ebner, F., Brandt, C., Thiele, P., Richter, D., Schliesser, U., Siffrin, V., Schueler, J., Stubbe, T., Ellinghaus, A., Meisel, C., *et al.* (2013). Microglial activation milieu controls regulatory T cell responses. *J Immunol* *191*, 5594-5602.

Edry, E., and Melamed, D. (2004). Receptor editing in positive and negative selection of B lymphopoiesis. *J Immunol* *173*, 4265-4271.

Ehrlich, L.I., Ogasawara, K., Hamerman, J.A., Takaki, R., Zingoni, A., Allison, J.P., and Lanier, L.L. (2005). Engagement of NKG2D by cognate ligand or antibody alone is insufficient to mediate costimulation of human and mouse CD8⁺ T cells. *J Immunol* *174*, 1922-1931.

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

Elhofy, A., Depaolo, R.W., Lira, S.A., Lukacs, N.W., and Karpus, W.J. (2009). Mice deficient for CCR6 fail to control chronic experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Neuroimmunol* *213*, 91-99.

Elliott, M.R., Chekeni, F.B., Trampont, P.C., Lazarowski, E.R., Kadl, A., Walk, S.F., Park, D., Woodson, R.I., Ostankovich, M., Sharma, P., *et al.* (2009). Nucleotides released by apoptotic cells act as a find-me signal to promote phagocytic clearance. *Nature* *461*, 282-286.

Elong Ngonu, A., Pettre, S., Salou, M., Bahbouhi, B., Soulillou, J.P., Brouard, S., and Laplaud, D.A. (2012). Frequency of circulating autoreactive T cells committed to myelin determinants in relapsing-remitting multiple sclerosis patients. *Clin Immunol* *144*, 117-126.

Engelhardt, B., Carare, R.O., Bechmann, I., Flugel, A., Laman, J.D., and Weller, R.O. (2016). Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol* *132*, 317-338.

Engelhardt, B., and Ransohoff, R.M. (2012). Capture, crawl, cross: the T cell code to breach the blood-brain barriers. *Trends Immunol* *33*, 579-589.

Erblich, B., Zhu, L., Etgen, A.M., Dobrenis, K., and Pollard, J.W. (2011). Absence of colony stimulation factor-1 receptor results in loss of microglia, disrupted brain development and olfactory deficits. *PLoS One* 6, e26317.

Espinoza, J.L., Takami, A., Onizuka, M., Sao, H., Akiyama, H., Miyamura, K., Okamoto, S., Inoue, M., Kanda, Y., Ohtake, S., *et al.* (2009). NKG2D gene polymorphism has a significant impact on transplant outcomes after HLA-fully-matched unrelated bone marrow transplantation for standard risk hematologic malignancies. *Haematologica* 94, 1427-1434.

Fantin, A., Vieira, J.M., Gestri, G., Denti, L., Schwarz, Q., Prykhozhiy, S., Peri, F., Wilson, S.W., and Ruhrberg, C. (2010). Tissue macrophages act as cellular chaperones for vascular anastomosis downstream of VEGF-mediated endothelial tip cell induction. *Blood* 116, 829-840.

Feng, B.J., Sun, L.D., Soltani-Arabshahi, R., Bowcock, A.M., Nair, R.P., Stuart, P., Elder, J.T., Schrodi, S.J., Begovich, A.B., Abecasis, G.R., *et al.* (2009). Multiple Loci within the major histocompatibility complex confer risk of psoriasis. *PLoS Genet* 5, e1000606.

Ferber, I., Schonrich, G., Schenkel, J., Mellor, A.L., Hammerling, G.J., and Arnold, B. (1994). Levels of peripheral T cell tolerance induced by different doses of tolerogen. *Science* 263, 674-676.

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.

Fernandez-Morera, J.L., Rodriguez-Rodero, S., Lahoz, C., Tunon, A., Astudillo, A., Garcia-Suarez, O., Martinez-Borra, J., Lopez-Vazquez, A., Rodrigo, L., Gonzalez, S., *et al.* (2008a). Soluble MHC class I chain-related protein B serum levels correlate with disease activity in relapsing-remitting multiple sclerosis. *Hum Immunol* 69, 235-240.

Fernandez-Morera, J.L., Rodriguez-Rodero, S., Tunon, A., Martinez-Borra, J., Vidal-Castineira, J.R., Lopez-Vazquez, A., Rodrigo, L., Rodrigo, P., Gonzalez, S., Lahoz, C.H., *et al.* (2008b). Genetic influence of the nonclassical major histocompatibility complex class I molecule MICB in multiple sclerosis susceptibility. *Tissue Antigens* 72, 54-59.

Fielding, C.A., Aicheler, R., Stanton, R.J., Wang, E.C., Han, S., Seirafian, S., Davies, J., McSharry, B.P., Weekes, M.P., Antrobus, P.R., *et al.* (2014). Two novel human cytomegalovirus NK cell evasion functions target MICA for lysosomal degradation. *PLoS Pathog* 10, e1004058.

Fields, R.D. (2008). White matter in learning, cognition and psychiatric disorders. *Trends Neurosci* 31, 361-370.

Fife, B.T., and Pauken, K.E. (2011). The role of the PD-1 pathway in autoimmunity and peripheral tolerance. *Ann N Y Acad Sci* 1217, 45-59.

Fischer, M.T., Sharma, R., Lim, J.L., Haider, L., Frischer, J.M., Drexhage, J., Mahad, D., Bradl, M., van Horssen, J., and Lassmann, H. (2012). NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* 135, 886-899.

Fitzgerald, D.C., Zhang, G.X., El-Behi, M., Fonseca-Kelly, Z., Li, H., Yu, S., Saris, C.J., Gran, B., Ciric, B., and Rostami, A. (2007). Suppression of autoimmune inflammation of the central nervous system by interleukin 10 secreted by interleukin 27-stimulated T cells. *Nat Immunol* 8, 1372-1379.

Fletcher, J.M., Lalor, S.J., Sweeney, C.M., Tubridy, N., and Mills, K.H. (2010). T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Clin Exp Immunol* 162, 1-11.

Fogdell-Hahn, A., Ligers, A., Gronning, M., Hillert, J., and Olerup, O. (2000). Multiple sclerosis: a modifying influence of HLA class I genes in an HLA class II associated autoimmune disease. *Tissue Antigens* 55, 140-148.

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. *Journal of immunology* 154, 4309-4321.

Frade, J.M., and Barde, Y.A. (1998). Microglia-derived nerve growth factor causes cell death in the developing retina. *Neuron* 20, 35-41.

Franklin, R.J. (2002). Why does remyelination fail in multiple sclerosis? *Nat Rev Neurosci* 3, 705-714.

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

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

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

- Fruh, K., Ahn, K., and Peterson, P.A. (1997). Inhibition of MHC class I antigen presentation by viral proteins. *J Mol Med (Berl)* 75, 18-27.
- Fugger, L., Friese, M.A., and Bell, J.I. (2009). From genes to function: the next challenge to understanding multiple sclerosis. *Nat Rev Immunol* 9, 408-417.
- Fujinami, R.S., and Oldstone, M.B. (1985). Amino acid homology between the encephalitogenic site of myelin basic protein and virus: mechanism for autoimmunity. *Science* 230, 1043-1045.
- Furuse, M., Fujita, K., Hiiiragi, T., Fujimoto, K., and Tsukita, S. (1998). Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. *J Cell Biol* 141, 1539-1550.
- Furuse, M., Hirase, T., Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. *J Cell Biol* 123, 1777-1788.
- Galazka, G., Jurewicz, A., Domowicz, M., Cannella, B., Raine, C.S., and Selmaj, K. (2014). HINT1 peptide/Hsp70 complex induces NK-cell-dependent immunoregulation in a model of autoimmune demyelination. *Eur J Immunol* 44, 3026-3044.
- Galazka, G., Jurewicz, A., Orłowski, W., Stasiolek, M., Brosnan, C.F., Raine, C.S., and Selmaj, K. (2007). EAE tolerance induction with Hsp70-peptide complexes depends on H60 and NKG2D activity. *J Immunol* 179, 4503-4512.
- Gallucci, S., Lolkema, M., and Matzinger, P. (1999). Natural adjuvants: endogenous activators of dendritic cells. *Nat Med* 5, 1249-1255.
- Gapin, L. (2014). Check MAIT. *J Immunol* 192, 4475-4480.
- Gardner, D., and Kandel, E.R. (1972). Diphasic postsynaptic potential: a chemical synapse capable of mediating conjoint excitation and inhibition. *Science* 176, 675-678.
- Garrity, D., Call, M.E., Feng, J., and Wucherpfennig, K.W. (2005). The activating NKG2D receptor assembles in the membrane with two signaling dimers into a hexameric structure. *Proc Natl Acad Sci U S A* 102, 7641-7646.
- Gartner, D., Hoff, H., Gimsa, U., Burmester, G.R., and Brunner-Weinzierl, M.C. (2006). CD25 regulatory T cells determine secondary but not primary remission in EAE: impact on long-term disease progression. *J Neuroimmunol* 172, 73-84.

- Gasser, S., Orsulic, S., Brown, E.J., and Raulet, D.H. (2005). The DNA damage pathway regulates innate immune system ligands of the NKG2D receptor. *Nature* 436, 1186-1190.
- Gaur, A., Boehme, S.A., Chalmers, D., Crowe, P.D., Pahuja, A., Ling, N., Brocke, S., Steinman, L., and Conlon, P.J. (1997). Amelioration of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis with altered myelin basic protein peptides involves different cellular mechanisms. *J Neuroimmunol* 74, 149-158.
- Gay, F.W., Drye, T.J., Dick, G.W., and Esiri, M.M. (1997). The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion. *Brain* 120, 1461-1483.
- Geginat, J., Paroni, M., Maglie, S., Alfen, J.S., Kastirr, I., Gruarin, P., De Simone, M., Pagani, M., and Abrignani, S. (2014). Plasticity of human CD4 T cell subsets. *Front Immunol* 5, 630.
- Genain, C.P., and Zamvil, S.S. (2000). Specific immunotherapy: one size does not fit all. *Nat Med* 6, 1098-1100.
- Georget, D.M., Underwood-Toscano, C., Powers, S.J., Shewry, P.R., and Belton, P.S. (2008). Effect of variety and environmental factors on gluten proteins: an analytical, spectroscopic, and rheological study. *J Agric Food Chem* 56, 1172-1179.
- Germain, R.N. (2002). T-cell development and the CD4-CD8 lineage decision. *Nature reviews Immunology* 2, 309-322.
- Giannetti, P., Politis, M., Su, P., Turkheimer, F.E., Malik, O., Keihaninejad, S., Wu, K., Waldman, A., Reynolds, R., Nicholas, R., *et al.* (2015). Increased PK11195-PET binding in normal-appearing white matter in clinically isolated syndrome. *Brain* 138, 110-119.
- Gieselmann, V., Zlotogora, J., Harris, A., Wenger, D.A., and Morris, C.P. (1994). Molecular genetics of metachromatic leukodystrophy. *Hum Mutat* 4, 233-242.
- Gilfillan, S., Ho, E.L., Cella, M., Yokoyama, W.M., and Colonna, M. (2002). NKG2D recruits two distinct adapters to trigger NK cell activation and costimulation. *Nat Immunol* 3, 1150-1155.
- Girardi, M., Oppenheim, D.E., Steele, C.R., Lewis, J.M., Glusac, E., Filler, R., Hobby, P., Sutton, B., Tigelaar, R.E., and Hayday, A.C. (2001). Regulation of cutaneous malignancy by gammadelta T cells. *Science* 294, 605-609.

- Giunti, D., Parodi, B., Cordano, C., Uccelli, A., and Kerlero de Rosbo, N. (2014). Can we switch microglia's phenotype to foster neuroprotection? Focus on multiple sclerosis. *Immunology* *141*, 328-339.
- Glienke, J., Sobanov, Y., Brostjan, C., Steffens, C., Nguyen, C., Lehrach, H., Hofer, E., and Francis, F. (1998). The genomic organization of NKG2C, E, F, and D receptor genes in the human natural killer gene complex. *Immunogenetics* *48*, 163-173.
- Gobin, S.J., Montagne, L., Van Zutphen, M., Van Der Valk, P., Van Den Elsen, P.J., and De Groot, C.J. (2001). Upregulation of transcription factors controlling MHC expression in multiple sclerosis lesions. *Glia* *36*, 68-77.
- Goldmann, T., and Prinz, M. (2013). Role of microglia in CNS autoimmunity. *Clin Dev Immunol* *2013*, 208093.
- Golubovskaya, V., and Wu, L. (2016). Different Subsets of T Cells, Memory, Effector Functions, and CAR-T Immunotherapy. *Cancers (Basel)* *8*.
- Gonzalez, S., Groh, V., and Spies, T. (2006). Immunobiology of human NKG2D and its ligands. *Curr Top Microbiol Immunol* *298*, 121-138.
- Gotter, J., Brors, B., Hergenahn, M., and Kyewski, B. (2004). Medullary epithelial cells of the human thymus express a highly diverse selection of tissue-specific genes colocalized in chromosomal clusters. *J Exp Med* *199*, 155-166.
- Goverman, J. (2009). Autoimmune T cell responses in the central nervous system. *Nat Rev Immunol* *9*, 393-407.
- Grabert, K., Michoel, T., Karavolos, M.H., Clohisey, S., Baillie, J.K., Stevens, M.P., Freeman, T.C., Summers, K.M., and McColl, B.W. (2016). Microglial brain region-dependent diversity and selective regional sensitivities to aging. *Nat Neurosci* *19*, 504-516.
- Gran, B., Zhang, G.X., Yu, S., Li, J., Chen, X.H., Ventura, E.S., Kamoun, M., and Rostami, A. (2002). IL-12p35-deficient mice are susceptible to experimental autoimmune encephalomyelitis: evidence for redundancy in the IL-12 system in the induction of central nervous system autoimmune demyelination. *J Immunol* *169*, 7104-7110.
- Greer, J.M. (2013). Autoimmune T-cell reactivity to myelin proteolipids and glycolipids in multiple sclerosis. *Mult Scler Int* *2013*, 151427.

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*, 328-334.

Griffith, J.W., Sokol, C.L., and Luster, A.D. (2014). Chemokines and chemokine receptors: positioning cells for host defense and immunity. *Annu Rev Immunol* *32*, 659-702.

Groh, V., Bahram, S., Bauer, S., Herman, A., Beauchamp, M., and Spies, T. (1996). Cell stress-regulated human major histocompatibility complex class I gene expressed in gastrointestinal epithelium. *Proc Natl Acad Sci U S A* *93*, 12445-12450.

Groh, V., Bruhl, A., El-Gabalawy, H., Nelson, J.L., and Spies, T. (2003). Stimulation of T cell autoreactivity by anomalous expression of NKG2D and its MIC ligands in rheumatoid arthritis. *Proc Natl Acad Sci U S A* *100*, 9452-9457.

Guermonprez, P., Valladeau, J., Zitvogel, L., Thery, C., and Amigorena, S. (2002). Antigen presentation and T cell stimulation by dendritic cells. *Annu Rev Immunol* *20*, 621-667.

Guerra, N., Pestal, K., Juarez, T., Beck, J., Tkach, K., Wang, L., and Raulet, D.H. (2013). A selective role of NKG2D in inflammatory and autoimmune diseases. *Clin Immunol* *149*, 432-439.

Guerra, N., Tan, Y.X., Joncker, N.T., Choy, A., Gallardo, F., Xiong, N., Knoblaugh, S., Cado, D., Greenberg, N.M., and Raulet, D.H. (2008). NKG2D-deficient mice are defective in tumor surveillance in models of spontaneous malignancy. *Immunity* *28*, 571-580.

Guerreiro, R., Wojtas, A., Bras, J., Carrasquillo, M., Rogaeva, E., Majounie, E., Cruchaga, C., Sassi, C., Kauwe, J.S., Younkin, S., *et al.* (2013). TREM2 variants in Alzheimer's disease. *N Engl J Med* *368*, 117-127.

Gunturi, A., Berg, R.E., and Forman, J. (2004). The role of CD94/NKG2 in innate and adaptive immunity. *Immunol Res* *30*, 29-34.

Guo, B., Chang, E.Y., and Cheng, G. (2008). The type I IFN induction pathway constrains Th17-mediated autoimmune inflammation in mice. *J Clin Invest* *118*, 1680-1690.

Gur, R.C., Turetsky, B.I., Matsui, M., Yan, M., Bilker, W., Huggett, P., and Gur, R.E. (1999). Sex differences in brain gray and white matter in healthy young adults: correlations with cognitive performance. *J Neurosci* *19*, 4065-4072.

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

Haas, J., Korporal, M., Balint, B., Fritzsching, B., Schwarz, A., and Wildemann, B. (2009). Glatiramer acetate improves regulatory T-cell function by expansion of naive CD4(+)CD25(+)FOXP3(+)CD31(+) T-cells in patients with multiple sclerosis. *J Neuroimmunol* *216*, 113-117.

Hamerman, J.A., Ogasawara, K., and Lanier, L.L. (2004). Cutting edge: Toll-like receptor signaling in macrophages induces ligands for the NKG2D receptor. *J Immunol* *172*, 2001-2005.

Hamilton, N.B., and Attwell, D. (2010). Do astrocytes really exocytose neurotransmitters? *Nat Rev Neurosci* *11*, 227-238.

Harbo, H.F., Lie, B.A., Sawcer, S., Celius, E.G., Dai, K.Z., Oturai, A., Hillert, J., Lorentzen, A.R., Laaksonen, M., Myhr, K.M., *et al.* (2004). Genes in the HLA class I region may contribute to the HLA class II-associated genetic susceptibility to multiple sclerosis. *Tissue Antigens* *63*, 237-247.

Harris, M.G., Hulseberg, P., Ling, C., Karman, J., Clarkson, B.D., Harding, J.S., Zhang, M., Sandor, A., Christensen, K., Nagy, A., *et al.* (2014). Immune privilege of the CNS is not the consequence of limited antigen sampling. *Sci Rep* *4*, 4422.

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*, 578-587.

Havenith, C.E., Askew, D., and Walker, W.S. (1998). Mouse resident microglia: isolation and characterization of immunoregulatory properties with naive CD4+ and CD8+ T-cells. *Glia* *22*, 348-359.

Hawkins, R.A., O'Kane, R.L., Simpson, I.A., and Vina, J.R. (2006). Structure of the blood-brain barrier and its role in the transport of amino acids. *J Nutr* *136*, 218S-226S.

Hayashi, T., Imai, K., Morishita, Y., Hayashi, I., Kusunoki, Y., and Nakachi, K. (2006). Identification of the NKG2D haplotypes associated with natural cytotoxic activity of peripheral blood lymphocytes and cancer immunosurveillance. *Cancer Res* *66*, 563-570.

He, S., Yin, T., Li, D., Gao, X., Wan, Y., Ma, X., Ye, T., Guo, F., Sun, J., Lin, Z., *et al.* (2013). Enhanced interaction between natural killer cells and lung cancer cells: involvement in gefitinib-mediated immunoregulation. *J Transl Med* *11*, 186.

Heinemann, A., Zhao, F., Pechlivanis, S., Eberle, J., Steinle, A., Diederichs, S., Schadendorf, D., and Paschen, A. (2012). Tumor suppressive microRNAs miR-34a/c control cancer cell expression of ULBP2, a stress-induced ligand of the natural killer cell receptor NKG2D. *Cancer Res* 72, 460-471.

Hemmer, B., Fleckenstein, B.T., Vergelli, M., Jung, G., McFarland, H., Martin, R., and Wiesmuller, K.H. (1997). Identification of high potency microbial and self ligands for a human autoreactive class II-restricted T cell clone. *J Exp Med* 185, 1651-1659.

Hendry, S.H., Jones, E.G., Emson, P.C., Lawson, D.E., Heizmann, C.W., and Streit, P. (1989). Two classes of cortical GABA neurons defined by differential calcium binding protein immunoreactivities. *Exp Brain Res* 76, 467-472.

Hermoye, L., Saint-Martin, C., Cosnard, G., Lee, S.K., Kim, J., Nassogne, M.C., Menten, R., Clapuyt, P., Donohue, P.K., Hua, K., *et al.* (2006). Pediatric diffusion tensor imaging: normal database and observation of the white matter maturation in early childhood. *Neuroimage* 29, 493-504.

Hiremath, M.M., Chen, V.S., Suzuki, K., Ting, J.P., and Matsushima, G.K. (2008). MHC class II exacerbates demyelination in vivo independently of T cells. *J Neuroimmunol* 203, 23-32.

Hirota, K., Duarte, J.H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D.J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., *et al.* (2011). Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses. *Nat Immunol* 12, 255-263.

Ho, E.L., Heusel, J.W., Brown, M.G., Matsumoto, K., Scalzo, A.A., and Yokoyama, W.M. (1998). Murine Nkg2d and Cd94 are clustered within the natural killer complex and are expressed independently in natural killer cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 6320-6325.

Hoebe, K., Janssen, E., and Beutler, B. (2004). The interface between innate and adaptive immunity. *Nat Immunol* 5, 971-974.

Hoehn, K.B., Fowler, A., Lunter, G., and Pybus, O.G. (2016). The Diversity and Molecular Evolution of B-Cell Receptors during Infection. *Mol Biol Evol* 33, 1147-1157.

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. *Brain pathology* 14, 43-50.

Hogarth, P.M., and Pietersz, G.A. (2012). Fc receptor-targeted therapies for the treatment of inflammation, cancer and beyond. *Nat Rev Drug Discov* 11, 311-331.

Hong, S., Beja-Glasser, V.F., Nfonoyim, B.M., Frouin, A., Li, S., Ramakrishnan, S., Merry, K.M., Shi, Q., Rosenthal, A., Barres, B.A., *et al.* (2016). Complement and microglia mediate early synapse loss in Alzheimer mouse models. *Science* 352, 712-716.

Hosomi, S., Grootjans, J., Tschurtschenthaler, M., Krupka, N., Matute, J.D., Flak, M.B., Martinez-Naves, E., Gomez Del Moral, M., Glickman, J.N., Ohira, M., *et al.* (2017). Intestinal epithelial cell endoplasmic reticulum stress promotes MULT1 up-regulation and NKG2D-mediated inflammation. *J Exp Med* 214, 2985-2997.

Houchins, J.P., Yabe, T., McSherry, C., and Bach, F.H. (1991). DNA sequence analysis of NKG2, a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells. *J Exp Med* 173, 1017-1020.

Howe, C.L., Ure, D., Adelson, J.D., LaFrance-Corey, R., Johnson, A., and Rodriguez, M. (2007). CD8⁺ T cells directed against a viral peptide contribute to loss of motor function by disrupting axonal transport in a viral model of fulminant demyelination. *J Neuroimmunol* 188, 13-21.

Hu, D., Weiner, H.L., and Ritz, J. (2013). Identification of cytolytic CD161⁺-CD56⁺ regulatory CD8 T cells in human peripheral blood. *PLoS One* 8, e59545.

Hu, J., Zhu, S., Xia, X., Zhang, L., Kleinerman, E.S., and Li, S. (2014). CD8⁺T cell-specific induction of NKG2D receptor by doxorubicin plus interleukin-12 and its contribution to CD8⁺T cell accumulation in tumors. *Mol Cancer* 13, 34.

Huang, H., Wang, X., Zhang, Y., Zheng, X., Wei, H., and Sun, R. (2010). Up-regulation of NKG2F receptor, a functionally unknown killer receptor, of human natural killer cells by interleukin-2 and interleukin-15. *Oncol Rep* 24, 1043-1048.

Huber, M., Heink, S., Pagenstecher, A., Reinhard, K., Ritter, J., Visekruna, A., Guralnik, A., Bollig, N., Jeltsch, K., Heinemann, C., *et al.* (2013). IL-17A secretion by CD8⁺ T cells supports Th17-mediated autoimmune encephalomyelitis. *J Clin Invest* 123, 247-260.

Hucke, S., Flossdorf, J., Grutzke, B., Dunay, I.R., Frenzel, K., Jungverdorben, J., Linnartz, B., Mack, M., Peitz, M., Brustle, O., *et al.* (2012). Licensing of myeloid cells promotes central nervous system autoimmunity and is controlled by peroxisome proliferator-activated receptor gamma. *Brain* 135, 1586-1605.

Huizinga, R., Hintzen, R.Q., Assink, K., van Meurs, M., and Amor, S. (2009). T-cell responses to neurofilament light protein are part of the normal immune repertoire. *Int Immunol* 21, 433-441.

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, 669-676.

Hussain, R.Z., Hayardeny, L., Cravens, P.C., Yarovinsky, F., Eagar, T.N., Arellano, B., Deason, K., Castro-Rojas, C., and Stuve, O. (2014). Immune surveillance of the central nervous system in multiple sclerosis - Relevance for therapy and experimental models. *Journal of neuroimmunology* 276, 9-17.

Hyman, S.E. (2005). Neurotransmitters. *Curr Biol* 15, R154-158.

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

Illiff, J.J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B.A., Peng, W., Gundersen, G.A., Benveniste, H., Vates, G.E., Deane, R., Goldman, S.A., *et al.* (2012). A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid beta. *Sci Transl Med* 4, 147ra111.

Ito, Y., Kanai, T., Totsuka, T., Okamoto, R., Tsuchiya, K., Nemoto, Y., Yoshioka, A., Tomita, T., Nagaishi, T., Sakamoto, N., *et al.* (2008). Blockade of NKG2D signaling prevents the development of murine CD4+ T cell-mediated colitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol* 294, G199-207.

Itoh, M., Nagafuchi, A., Yonemura, S., Kitani-Yasuda, T., Tsukita, S., and Tsukita, S. (1993). The 220-kD protein colocalizing with cadherins in non-epithelial cells is identical to ZO-1, a tight junction-associated protein in epithelial cells: cDNA cloning and immunoelectron microscopy. *J Cell Biol* 121, 491-502.

Iwasaki, A., and Medzhitov, R. (2015). Control of adaptive immunity by the innate immune system. *Nat Immunol* 16, 343-353.

Jablonska, B., Aguirre, A., Raymond, M., Szabo, G., Kitabatake, Y., Sailor, K.A., Ming, G.L., Song, H., and Gallo, V. (2010). Chordin-induced lineage plasticity of adult SVZ neuroblasts after demyelination. *Nat Neurosci* 13, 541-550.

Jack, C.S., Arbour, N., Manusow, J., Montgrain, V., Blain, M., McCrea, E., Shapiro, A., and Antel, J.P. (2005). TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes. *J Immunol* 175, 4320-4330.

Jacobs, B.L., and Azmitia, E.C. (1992). Structure and function of the brain serotonin system. *Physiol Rev* 72, 165-229.

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, 538-550.

Jadidi-Niaragh, F., and Mirshafiey, A. (2011). Regulatory T-cell as orchestra leader in immunosuppression process of multiple sclerosis. *Immunopharmacol Immunotoxicol* 33, 545-567.

Jager, A., Dardalhon, V., Sobel, R.A., Bettelli, E., and Kuchroo, V.K. (2009). Th1, Th17, and Th9 effector cells induce experimental autoimmune encephalomyelitis with different pathological phenotypes. *J Immunol* 183, 7169-7177.

Jahng, A., Maricic, I., Aguilera, C., Cardell, S., Halder, R.C., and Kumar, V. (2004). Prevention of autoimmunity by targeting a distinct, noninvariant CD1d-reactive T cell population reactive to sulfatide. *J Exp Med* 199, 947-957.

Jamieson, A.M., Diefenbach, A., McMahon, C.W., Xiong, N., Carlyle, J.R., and Raulet, D.H. (2002). The role of the NKG2D immunoreceptor in immune cell activation and natural killing. *Immunity* 17, 19-29.

Jansen, A.H., Reits, E.A., and Hol, E.M. (2014). The ubiquitin proteasome system in glia and its role in neurodegenerative diseases. *Frontiers in molecular neuroscience* 7, 73.

Jarry, U., Jeannin, P., Pineau, L., Donnou, S., Delneste, Y., and Couez, D. (2013). Efficiently stimulated adult microglia cross-prime naive CD8(+) T cells injected in the brain. *Eur J Immunol* 43, 1173-1184.

Jessen, N.A., Munk, A.S., Lundgaard, I., and Nedergaard, M. (2015). The Glymphatic System: A Beginner's Guide. *Neurochem Res* 40, 2583-2599.

Ji, Q., Castelli, L., and Goverman, J.M. (2013). MHC class I-restricted myelin epitopes are cross-presented by Tip-DCs that promote determinant spreading to CD8(+) T cells. *Nat Immunol* 14, 254-261.

Ji, Q., Perchellet, A., and Goverman, J.M. (2010). Viral infection triggers central nervous system autoimmunity via activation of CD8+ T cells expressing dual TCRs. *Nat Immunol* 11, 628-634.

Jiang, H., and Chess, L. (2004). An integrated view of suppressor T cell subsets in immunoregulation. *J Clin Invest* 114, 1198-1208.

Jiang, H., Ware, R., Stall, A., Flaherty, L., Chess, L., and Pernis, B. (1995). Murine CD8⁺ T cells that specifically delete autologous CD4⁺ T cells expressing V beta 8 TCR: a role of the Qa-1 molecule. *Immunity* 2, 185-194.

Jilek, S., Schlupe, M., Rossetti, A.O., Guignard, L., Le Goff, G., Pantaleo, G., and Du Pasquier, R.A. (2007). CSF enrichment of highly differentiated CD8⁺ T cells in early multiple sclerosis. *Clin Immunol* 123, 105-113.

Jin, Y.H., Mohindru, M., Kang, M.H., Fuller, A.C., Kang, B., Gallo, D., and Kim, B.S. (2007). Differential virus replication, cytokine production, and antigen-presenting function by microglia from susceptible and resistant mice infected with Theiler's virus. *Journal of virology* 81, 11690-11702.

Jinushi, M., Takehara, T., Kanto, T., Tatsumi, T., Groh, V., Spies, T., Miyagi, T., Suzuki, T., Sasaki, Y., and Hayashi, N. (2003). Critical role of MHC class I-related chain A and B expression on IFN-alpha-stimulated dendritic cells in NK cell activation: impairment in chronic hepatitis C virus infection. *J Immunol* 170, 1249-1256.

Johansson, S., Berg, L., Hall, H., and Hoglund, P. (2005). NK cells: elusive players in autoimmunity. *Trends Immunol* 26, 613-618.

Johnson, K.P., Brooks, B.R., Ford, C.C., Goodman, A., Guarnaccia, J., Lisak, R.P., Myers, L.W., Panitch, H.S., Pruitt, A., Rose, J.W., *et al.* (2000). Sustained clinical benefits of glatiramer acetate in relapsing multiple sclerosis patients observed for 6 years. Copolymer 1 Multiple Sclerosis Study Group. *Mult Scler* 6, 255-266.

Jones, J.L., Anderson, J.M., Phuah, C.L., Fox, E.J., Selmaj, K., Margolin, D., Lake, S.L., Palmer, J., Thompson, S.J., Wilkins, A., *et al.* (2010). Improvement in disability after alemtuzumab treatment of multiple sclerosis is associated with neuroprotective autoimmunity. *Brain* 133, 2232-2247.

Juedes, A.E., and Ruddle, N.H. (2001). Resident and infiltrating central nervous system APCs regulate the emergence and resolution of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology* 166, 5168-5175.

Jung, H., Hsiung, B., Pestal, K., Procyk, E., and Raulet, D.H. (2012). RAE-1 ligands for the NKG2D receptor are regulated by E2F transcription factors, which control cell cycle entry. *J Exp Med* 209, 2409-2422.

Jungblut, M., Tiveron, M.C., Barral, S., Abrahamsen, B., Knobel, S., Pennartz, S., Schmitz, J., Perraut, M., Pfrieger, F.W., Stoffel, W., *et al.* (2012). Isolation and characterization of living primary astroglial cells using the new GLAST-specific monoclonal antibody ACSA-1. *Glia* *60*, 894-907.

Junker, A., Ivanidze, J., Malotka, J., Eiglmeier, I., Lassmann, H., Wekerle, H., Meinl, E., Hohlfeld, R., and Dornmair, K. (2007). Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain : a journal of neurology* *130*, 2789-2799.

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*, 3056-3059.

Kabat, E.A., Wolf, A., Bezer, A.E., and Murray, J.P. (1951). Studies on acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in rhesus monkeys. *J Exp Med* *93*, 615-633.

Karimi, M.A., Aguilar, O., Zou, B., Bachmann, M.H., Carlyle, J.R., Baldwin, C.L., and Kambayashi, T. (2014). A truncated human NKG2D splice isoform negatively regulates NKG2D-mediated function. *J Immunol* *193*, 2764-2771.

Kato, N., Tanaka, J., Sugita, J., Toubai, T., Miura, Y., Ibata, M., Syono, Y., Ota, S., Kondo, T., Asaka, M., *et al.* (2007). Regulation of the expression of MHC class I-related chain A, B (MICA, MICB) via chromatin remodeling and its impact on the susceptibility of leukemic cells to the cytotoxicity of NKG2D-expressing cells. *Leukemia* *21*, 2103-2108.

Kawamoto, S., Maruya, M., Kato, L.M., Suda, W., Atarashi, K., Doi, Y., Tsutsui, Y., Qin, H., Honda, K., Okada, T., *et al.* (2014). Foxp3(+) T cells regulate immunoglobulin a selection and facilitate diversification of bacterial species responsible for immune homeostasis. *Immunity* *41*, 152-165.

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

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

Keir, M.E., Butte, M.J., Freeman, G.J., and Sharpe, A.H. (2008). PD-1 and its ligands in tolerance and immunity. *Annu Rev Immunol* *26*, 677-704.

Khakh, B.S., and Sofroniew, M.V. (2015). Diversity of astrocyte functions and phenotypes in neural circuits. *Nat Neurosci* *18*, 942-952.

Kidd, D., Barkhof, F., McConnell, R., Algra, P.R., Allen, I.V., and Revesz, T. (1999). Cortical lesions in multiple sclerosis. *Brain* 122 (Pt 1), 17-26.

Kieseier, B.C. (2011). The mechanism of action of interferon-beta in relapsing multiple sclerosis. *CNS Drugs* 25, 491-502.

Kim, J., Chang, C.K., Hayden, T., Liu, F.C., Benjamin, J., Hamerman, J.A., Lanier, L.L., and Kang, S.M. (2007). The activating immunoreceptor NKG2D and its ligands are involved in allograft transplant rejection. *J Immunol* 179, 6416-6420.

Kirsten, H., Petit-Teixeira, E., Scholz, M., Hasenclever, D., Hantmann, H., Heider, D., Wagner, U., Sack, U., Hugo Teixeira, V., Prum, B., *et al.* (2009). Association of MICA with rheumatoid arthritis independent of known HLA-DRB1 risk alleles in a family-based and a case control study. *Arthritis Res Ther* 11, R60.

Kister, I., Bacon, T.E., Chamot, E., Salter, A.R., Cutter, G.R., Kalina, J.T., and Herbert, J. (2013). Natural history of multiple sclerosis symptoms. *Int J MS Care* 15, 146-158.

Kivisakk, P., Imitola, J., Rasmussen, S., Elyaman, W., Zhu, B., Ransohoff, R.M., and Khoury, S.J. (2009). Localizing central nervous system immune surveillance: meningeal antigen-presenting cells activate T cells during experimental autoimmune encephalomyelitis. *Annals of neurology* 65, 457-469.

Kivisakk, P., Mahad, D.J., Callahan, M.K., Sikora, K., Trebst, C., Tucky, B., Wujek, J., Ravid, R., Staugaitis, S.M., Lassmann, H., *et al.* (2004). Expression of CCR7 in multiple sclerosis: implications for CNS immunity. *Annals of neurology* 55, 627-638.

Kjellev, S., Haase, C., Lundsgaard, D., Urso, B., Tornehave, D., and Markholst, H. (2007). Inhibition of NKG2D receptor function by antibody therapy attenuates transfer-induced colitis in SCID mice. *Eur J Immunol* 37, 1397-1406.

Kleinewietfeld, M., and Hafler, D.A. (2014). Regulatory T cells in autoimmune neuroinflammation. *Immunol Rev* 259, 231-244.

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

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

- Kohm, A.P., Carpentier, P.A., Anger, H.A., and Miller, S.D. (2002). Cutting edge: CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells suppress antigen-specific autoreactive immune responses and central nervous system inflammation during active experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* *169*, 4712-4716.
- Kondo, M., Maruoka, T., Otsuka, N., Kasamatsu, J., Fugo, K., Hanzawa, N., and Kasahara, M. (2010). Comparative genomic analysis of mammalian NKG2D ligand family genes provides insights into their origin and evolution. *Immunogenetics* *62*, 441-450.
- Kooi, E.J., van Horssen, J., Witte, M.E., Amor, S., Bo, L., Dijkstra, C.D., van der Valk, P., and Geurts, J.J. (2009). Abundant extracellular myelin in the meninges of patients with multiple sclerosis. *Neuropathol Appl Neurobiol* *35*, 283-295.
- Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T.R., Backstrom, B.T., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., Strom, T.B., *et al.* (2007). Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation. *Nat Med* *13*, 423-431.
- Korporal, M., Haas, J., Balint, B., Fritzsching, B., Schwarz, A., Moeller, S., Fritz, B., Suri-Payer, E., and Wildemann, B. (2008). Interferon beta-induced restoration of regulatory T-cell function in multiple sclerosis is prompted by an increase in newly generated naive regulatory T cells. *Arch Neurol* *65*, 1434-1439.
- Kotter, M.R., Li, W.W., Zhao, C., and Franklin, R.J. (2006). Myelin impairs CNS remyelination by inhibiting oligodendrocyte precursor cell differentiation. *J Neurosci* *26*, 328-332.
- Kreymborg, K., Etzensperger, R., Dumoutier, L., Haak, S., Rebollo, A., Buch, T., Heppner, F.L., Renaud, J.C., and Becher, B. (2007). IL-22 is expressed by Th17 cells in an IL-23-dependent fashion, but not required for the development of autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* *179*, 8098-8104.
- Krishnamoorthy, G., Saxena, A., Mars, L.T., Domingues, H.S., Mentele, R., Ben-Nun, A., Lassmann, H., Dornmair, K., Kurschus, F.C., Liblau, R.S., *et al.* (2009). Myelin-specific T cells also recognize neuronal autoantigen in a transgenic mouse model of multiple sclerosis. *Nat Med* *15*, 626-632.
- Kroenke, M.A., Carlson, T.J., Andjelkovic, A.V., and Segal, B.M. (2008). IL-12- and IL-23-modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *J Exp Med* *205*, 1535-1541.
- Krumbholz, M., Derfuss, T., Hohlfeld, R., and Meinl, E. (2012). B cells and antibodies in multiple sclerosis pathogenesis and therapy. *Nat Rev Neurol* *8*, 613-623.

Kuchroo, V.K., Anderson, A.C., Waldner, H., Munder, M., Bettelli, E., and Nicholson, L.B. (2002). T cell response in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): role of self and cross-reactive antigens in shaping, tuning, and regulating the autopathogenic T cell repertoire. *Annu Rev Immunol* 20, 101-123.

Kuhlmann, T., Lingfeld, G., Bitsch, A., Schuchardt, J., and Bruck, W. (2002). Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* 125, 2202-2212.

Kuhlmann, T., Miron, V., Cui, Q., Wegner, C., Antel, J., and Bruck, W. (2008). Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* 131, 1749-1758.

Kuhns, M.S., Davis, M.M., and Garcia, K.C. (2006). Deconstructing the form and function of the TCR/CD3 complex. *Immunity* 24, 133-139.

Kumar, H., Kawai, T., and Akira, S. (2011). Pathogen recognition by the innate immune system. *Int Rev Immunol* 30, 16-34.

Kumar, N., Narang, K., Cressey, B.D., and Gottlieb, A.B. (2013). Long-term safety of ustekinumab for psoriasis. *Expert Opin Drug Saf* 12, 757-765.

Kyewski, B., and Derbinski, J. (2004). Self-representation in the thymus: an extended view. *Nat Rev Immunol* 4, 688-698.

La Flamme, A.C., Ruddenklau, K., and Backstrom, B.T. (2003). Schistosomiasis decreases central nervous system inflammation and alters the progression of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Infection and immunity* 71, 4996-5004.

Lafuente, E.M., and Reche, P.A. (2009). Prediction of MHC-peptide binding: a systematic and comprehensive overview. *Curr Pharm Des* 15, 3209-3220.

Lai, L., Alaverdi, N., Maltais, L., and Morse, H.C., 3rd (1998). Mouse cell surface antigens: nomenclature and immunophenotyping. *J Immunol* 160, 3861-3868.

Laman, J.D., and Weller, R.O. (2013). Drainage of cells and soluble antigen from the CNS to regional lymph nodes. *J Neuroimmune Pharmacol* 8, 840-856.

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, 233-240.

Lanier, L.L. (2015). NKG2D Receptor and Its Ligands in Host Defense. *Cancer Immunol Res* 3, 575-582.

Lanier, L.L., Corliss, B., Wu, J., and Phillips, J.H. (1998). Association of DAP12 with activating CD94/NKG2C NK cell receptors. *Immunity* 8, 693-701.

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

Larochelle, C., Cayrol, R., Kebir, H., Alvarez, J.I., Lecuyer, M.A., Ifergan, I., Viel, E., Bourbonniere, L., Beauseigle, D., Terouz, S., *et al.* (2012). Melanoma cell adhesion molecule identifies encephalitogenic T lymphocytes and promotes their recruitment to the central nervous system. *Brain* 135, 2906-2924.

Larochelle, C., Lecuyer, M.A., Alvarez, J.I., Charabati, M., Saint-Laurent, O., Ghannam, S., Kebir, H., Flanagan, K., Yednock, T., Duquette, P., *et al.* (2015). MCAM CD8 T lymphocytes mediate CNS inflammation. *Ann Neurol* doi: 10.1002/ana.24415.

Lassmann, H. (2004). Recent neuropathological findings in MS--implications for diagnosis and therapy. *J Neurol* 251 Suppl 4, IV2-5.

Lassmann, H. (2014). Mechanisms of white matter damage in multiple sclerosis. *Glia* 62, 1816-1830.

Lassmann, H. (2018). Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harb Perspect Med* 8.

Lassmann, H., and Bradl, M. (2017). Multiple sclerosis: experimental models and reality. *Acta Neuropathol* 133, 223-244.

Lassmann, H., van Horssen, J., and Mahad, D. (2012). Progressive multiple sclerosis: pathology and pathogenesis. *Nat Rev Neurol* 8, 647-656.

Lauterbach, H., Zuniga, E.I., Truong, P., Oldstone, M.B., and McGavern, D.B. (2006). Adoptive immunotherapy induces CNS dendritic cell recruitment and antigen presentation during clearance of a persistent viral infection. *The Journal of experimental medicine* 203, 1963-1975.

Laydon, D.J., Bangham, C.R., and Asquith, B. (2015). Estimating T-cell repertoire diversity: limitations of classical estimators and a new approach. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* 370.

- Le Bourhis, L., Guerri, L., Dusseaux, M., Martin, E., Soudais, C., and Lantz, O. (2011). Mucosal-associated invariant T cells: unconventional development and function. *Trends Immunol* 32, 212-218.
- LeBien, T.W., and Tedder, T.F. (2008). B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* 112, 1570-1580.
- Lecuyer, M.A., Kebir, H., and Prat, A. (2016). Glial influences on BBB functions and molecular players in immune cell trafficking. *Biochim Biophys Acta* 1862, 472-482.
- Lee, I.F., Qin, H., Priatel, J.J., and Tan, R. (2008a). Critical role for IFN-gamma in natural killer cell-mediated protection from diabetes. *Eur J Immunol* 38, 82-89.
- Lee, I.F., Qin, H., Trudeau, J., Dutz, J., and Tan, R. (2004). Regulation of autoimmune diabetes by complete Freund's adjuvant is mediated by NK cells. *J Immunol* 172, 937-942.
- Lee, Y.H., Ishida, Y., Rifa'i, M., Shi, Z., Isobe, K., and Suzuki, H. (2008b). Essential role of CD8+CD122+ regulatory T cells in the recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 180, 825-832.
- Lee, Y.K., Menezes, J.S., Umesaki, Y., and Mazmanian, S.K. (2011). Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108 Suppl 1, 4615-4622.
- Legroux, L., and Arbour, N. (2015). Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. *J Neuroimmune Pharmacol* 10, 528-546.
- Ley, K. (2014). The second touch hypothesis: T cell activation, homing and polarization. *F1000Res* 3, 37.
- Li, H., Lakshmikanth, T., Garofalo, C., Enge, M., Spinnler, C., Anichini, A., Szekely, L., Karre, K., Carbone, E., and Selivanova, G. (2011). Pharmacological activation of p53 triggers anticancer innate immune response through induction of ULBP2. *Cell Cycle* 10, 3346-3358.
- Li, Y., Chu, N., Hu, A., Gran, B., Rostami, A., and Zhang, G.X. (2007). Increased IL-23p19 expression in multiple sclerosis lesions and its induction in microglia. *Brain* 130, 490-501.
- Li, Z., Groh, V., Strong, R.K., and Spies, T. (2000). A single amino acid substitution causes loss of expression of a MICA allele. *Immunogenetics* 51, 246-248.
- Li, Z., Zhang, C., Zhou, Z., Zhang, J., Zhang, J., and Tian, Z. (2012). Small intestinal intraepithelial lymphocytes expressing CD8 and T cell receptor gammadelta are involved in

bacterial clearance during *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection. *Infect Immun* 80, 565-574.

Liblau, R., Tournier-Lasserre, E., Maciazek, J., Dumas, G., Siffert, O., Hashim, G., and Bach, M.A. (1991). T cell response to myelin basic protein epitopes in multiple sclerosis patients and healthy subjects. *Eur J Immunol* 21, 1391-1395.

Liblau, R.S., Singer, S.M., and McDevitt, H.O. (1995). Th1 and Th2 CD4⁺ T cells in the pathogenesis of organ-specific autoimmune diseases. *Immunol Today* 16, 34-38.

Liddelow, S.A., Guttenplan, K.A., Clarke, L.E., Bennett, F.C., Bohlen, C.J., Schirmer, L., Bennett, M.L., Munch, A.E., Chung, W.S., Peterson, T.C., *et al.* (2017). Neurotoxic reactive astrocytes are induced by activated microglia. *Nature* 541, 481-487.

Lieto, L.D., Maasho, K., West, D., Borrego, F., and Coligan, J.E. (2006). The human CD94 gene encodes multiple, expressible transcripts including a new partner of NKG2A/B. *Genes Immun* 7, 36-43.

Lin, D., Lavender, H., Soilleux, E.J., and O'Callaghan, C.A. (2012). NF-kappaB regulates MICA gene transcription in endothelial cell through a genetically inhibitable control site. *J Biol Chem* 287, 4299-4310.

Lindsey, J.W., Hodgkinson, S., Mehta, R., Mitchell, D., Enzmann, D., and Steinman, L. (1994). Repeated treatment with chimeric anti-CD4 antibody in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 36, 183-189.

Link, H. (1998). The cytokine storm in multiple sclerosis. *Mult Scler* 4, 12-15.

Liu, G., Atteridge, C.L., Wang, X., Lundgren, A.D., and Wu, J.D. (2010a). The membrane type matrix metalloproteinase MMP14 mediates constitutive shedding of MHC class I chain-related molecule A independent of A disintegrin and metalloproteinases. *J Immunol* 184, 3346-3350.

Liu, W., Putnam, A.L., Xu-Yu, Z., Szot, G.L., Lee, M.R., Zhu, S., Gottlieb, P.A., Kapranov, P., Gingeras, T.R., Fazekas de St Groth, B., *et al.* (2006). CD127 expression inversely correlates with FoxP3 and suppressive function of human CD4⁺ T reg cells. *J Exp Med* 203, 1701-1711.

Liu, Y., Bando, Y., Vargas-Lowy, D., Elyaman, W., Khoury, S.J., Huang, T., Reif, K., and Chitnis, T. (2010b). CD200R1 agonist attenuates mechanisms of chronic disease in a murine model of multiple sclerosis. *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience* 30, 2025-2038.

Llewellyn-Smith, N., Lai, M., Miller, D.H., Rudge, P., Thompson, A.J., and Cuzner, M.L. (1997). Effects of anti-CD4 antibody treatment on lymphocyte subsets and stimulated tumor necrosis factor alpha production: a study of 29 multiple sclerosis patients entered into a clinical trial of cM-T412. *Neurology* 48, 810-816.

Lodoen, M., Ogasawara, K., Hamerman, J.A., Arase, H., Houchins, J.P., Mocarski, E.S., and Lanier, L.L. (2003). NKG2D-mediated natural killer cell protection against cytomegalovirus is impaired by viral gp40 modulation of retinoic acid early inducible 1 gene molecules. *J Exp Med* 197, 1245-1253.

Lodoen, M.B., and Lanier, L.L. (2006). Natural killer cells as an initial defense against pathogens. *Curr Opin Immunol* 18, 391-398.

London, A., Benhar, I., and Schwartz, M. (2013). The retina as a window to the brain—from eye research to CNS disorders. *Nat Rev Neurol* 9, 44-53.

Lopez-Soto, A., Quinones-Lombrana, A., Lopez-Arbesu, R., Lopez-Larrea, C., and Gonzalez, S. (2006). Transcriptional regulation of ULBP1, a human ligand of the NKG2D receptor. *J Biol Chem* 281, 30419-30430.

Louveau, A., Plog, B.A., Antila, S., Alitalo, K., Nedergaard, M., and Kipnis, J. (2017). Understanding the functions and relationships of the glymphatic system and meningeal lymphatics. *J Clin Invest* 127, 3210-3219.

Louveau, A., Smirnov, I., Keyes, T.J., Eccles, J.D., Rouhani, S.J., Peske, J.D., Derecki, N.C., Castle, D., Mandell, J.W., Lee, K.S., *et al.* (2015). Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* 523, 337-341.

Lovett-Racke, A.E., Yang, Y., and Racke, M.K. (2011). Th1 versus Th17: are T cell cytokines relevant in multiple sclerosis? *Biochim Biophys Acta* 1812, 246-251.

Lowther, D.E., and Hafler, D.A. (2012). Regulatory T cells in the central nervous system. *Immunol Rev* 248, 156-169.

Lu, L., Kim, H.J., Werneck, M.B., and Cantor, H. (2008). Regulation of CD8⁺ regulatory T cells: Interruption of the NKG2A-Qa-1 interaction allows robust suppressive activity and resolution of autoimmune disease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105, 19420-19425.

Lublin, F.D., Knobler, R.L., Kalman, B., Goldhaber, M., Marini, J., Perrault, M., D'Imperio, C., Joseph, J., Alkan, S.S., and Korngold, R. (1993). Monoclonal anti-gamma interferon antibodies enhance experimental allergic encephalomyelitis. *Autoimmunity* 16, 267-274.

Lucca, L.E., Desbois, S., Ramadan, A., Ben-Nun, A., Eisenstein, M., Carrie, N., Guery, J.C., Sette, A., Nguyen, P., Geiger, T.L., *et al.* (2014). Bispecificity for myelin and neuronal self-antigens is a common feature of CD4 T cells in C57BL/6 mice. *J Immunol* *193*, 3267-3277.

Lucchinetti, C.F., Bruck, W., Rodriguez, M., and Lassmann, H. (1996). Distinct patterns of multiple sclerosis pathology indicates heterogeneity on pathogenesis. *Brain Pathol* *6*, 259-274.

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

Lui, H., Zhang, J., Makinson, S.R., Cahill, M.K., Kelley, K.W., Huang, H.Y., Shang, Y., Oldham, M.C., Martens, L.H., Gao, F., *et al.* (2016). Progranulin Deficiency Promotes Circuit-Specific Synaptic Pruning by Microglia via Complement Activation. *Cell* *165*, 921-935.

Lunemann, A., Lunemann, J.D., Roberts, S., Messmer, B., Barreira da Silva, R., Raine, C.S., and Munz, C. (2008). Human NK cells kill resting but not activated microglia via NKG2D- and NKp46-mediated recognition. *J Immunol* *181*, 6170-6177.

Lutterotti, A., and Martin, R. (2014). Antigen-specific tolerization approaches in multiple sclerosis. *Expert Opin Investig Drugs* *23*, 9-20.

Ma, C.S., Deenick, E.K., Batten, M., and Tangye, S.G. (2012). The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *J Exp Med* *209*, 1241-1253.

Maasho, K., Opoku-Anane, J., Marusina, A.I., Coligan, J.E., and Borrego, F. (2005). NKG2D is a costimulatory receptor for human naive CD8⁺ T cells. *J Immunol* *174*, 4480-4484.

Machado-Santos, J., Saji, E., Troscher, A.R., Paunovic, M., Liblau, R., Gabriely, G., Bien, C.G., Bauer, J., and Lassmann, H. (2018). The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8⁺ T lymphocytes and B cells. *Brain* *141*, 2066-2082.

MacVicar, B.A., and Newman, E.A. (2015). Astrocyte regulation of blood flow in the brain. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*.

Magliozzi, R., Howell, O., Vora, A., Serafini, B., Nicholas, R., Puopolo, M., Reynolds, R., and Aloisi, F. (2007). Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* *130*, 1089-1104.

- Major, E.O. (2010). Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies. *Annu Rev Med* 61, 35-47.
- Mann, E.R., and Li, X. (2014). Intestinal antigen-presenting cells in mucosal immune homeostasis: crosstalk between dendritic cells, macrophages and B-cells. *World J Gastroenterol* 20, 9653-9664.
- Maricic, I., Halder, R., Bischof, F., and Kumar, V. (2014). Dendritic cells and anergic type I NKT cells play a crucial role in sulfatide-mediated immune regulation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 193, 1035-1046.
- Marin-Teva, J.L., Dusart, I., Colin, C., Gervais, A., van Rooijen, N., and Mallat, M. (2004). Microglia promote the death of developing Purkinje cells. *Neuron* 41, 535-547.
- Markiewicz, M.A., Carayannopoulos, L.N., Naidenko, O.V., Matsui, K., Burack, W.R., Wise, E.L., Fremont, D.H., Allen, P.M., Yokoyama, W.M., Colonna, M., *et al.* (2005). Costimulation through NKG2D enhances murine CD8⁺ CTL function: similarities and differences between NKG2D and CD28 costimulation. *J Immunol* 175, 2825-2833.
- Marrack, P., Kappler, J., and Kotzin, B.L. (2001). Autoimmune disease: why and where it occurs. *Nat Med* 7, 899-905.
- Mars, L.T., Saikali, P., Liblau, R.S., and Arbour, N. (2011). Contribution of CD8 T lymphocytes to the immuno-pathogenesis of multiple sclerosis and its animal models. *Biochim Biophys Acta* 1812, 151-161.
- Martin-Padura, I., Lostaglio, S., Schneemann, M., Williams, L., Romano, M., Fruscella, P., Panzeri, C., Stoppacciaro, A., Ruco, L., Villa, A., *et al.* (1998). Junctional adhesion molecule, a novel member of the immunoglobulin superfamily that distributes at intercellular junctions and modulates monocyte transmigration. *J Cell Biol* 142, 117-127.
- Martinez-Forero, I., Garcia-Munoz, R., Martinez-Pasamar, S., Inoges, S., Lopez-Diaz de Cerio, A., Palacios, R., Sepulcre, J., Moreno, B., Gonzalez, Z., Fernandez-Diez, B., *et al.* (2008). IL-10 suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 38, 576-586.
- Masson, F., Calzascia, T., Di Bernardino-Besson, W., de Tribolet, N., Dietrich, P.Y., and Walker, P.R. (2007). Brain microenvironment promotes the final functional maturation of tumor-specific effector CD8⁺ T cells. *J Immunol* 179, 845-853.
- Matthys, P., Vermeire, K., Mitera, T., Heremans, H., Huang, S., and Billiau, A. (1998). Anti-IL-12 antibody prevents the development and progression of collagen-induced arthritis in IFN-gamma receptor-deficient mice. *Eur J Immunol* 28, 2143-2151.

Matusali, G., Tchidjou, H.K., Pontrelli, G., Bernardi, S., D'Ettorre, G., Vullo, V., Buonomini, A.R., Andreoni, M., Santoni, A., Cerboni, C., *et al.* (2013). Soluble ligands for the NKG2D receptor are released during HIV-1 infection and impair NKG2D expression and cytotoxicity of NK cells. *FASEB J* 27, 2440-2450.

Matyszak, M.K., Denis-Donini, S., Citterio, S., Longhi, R., Granucci, F., and Ricciardi-Castagnoli, P. (1999). Microglia induce myelin basic protein-specific T cell anergy or T cell activation, according to their state of activation. *Eur J Immunol* 29, 3063-3076.

Mayo, L., Quintana, F.J., and Weiner, H.L. (2012). The innate immune system in demyelinating disease. *Immunol Rev* 248, 170-187.

McGeachy, M.J., Stephens, L.A., and Anderson, S.M. (2005). Natural recovery and protection from autoimmune encephalomyelitis: contribution of CD4+CD25+ regulatory cells within the central nervous system. *J Immunol* 175, 3025-3032.

McHeyzer-Williams, L.J., and McHeyzer-Williams, M.G. (2005). Antigen-specific memory B cell development. *Annu Rev Immunol* 23, 487-513.

McMahon, E.J., Bailey, S.L., Castenada, 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, 335-339.

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

McRae, B.L., Vanderlugt, C.L., Dal Canto, M.C., and Miller, S.D. (1995). Functional evidence for epitope spreading in the relapsing pathology of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 182, 75-85.

Mecha, M., Carrillo-Salinas, F.J., Mestre, L., Feliu, A., and Guaza, C. (2013). Viral models of multiple sclerosis: neurodegeneration and demyelination in mice infected with Theiler's virus. *Prog Neurobiol* 101-102, 46-64.

Meffre, E., and Wardemann, H. (2008). B-cell tolerance checkpoints in health and autoimmunity. *Curr Opin Immunol* 20, 632-638.

Mellergard, J., Edstrom, M., Vrethem, M., Ernerudh, J., and Dahle, C. (2010). Natalizumab treatment in multiple sclerosis: marked decline of chemokines and cytokines in cerebrospinal fluid. *Mult Scler* 16, 208-217.

Mempel, T.R., Henrickson, S.E., and Von Andrian, U.H. (2004). T-cell priming by dendritic cells in lymph nodes occurs in three distinct phases. *Nature* 427, 154-159.

Meresse, B., Chen, Z., Ciszewski, C., Tretiakova, M., Bhagat, G., Krausz, T.N., Raulet, D.H., Lanier, L.L., Groh, V., Spies, T., *et al.* (2004). Coordinated induction by IL15 of a TCR-independent NKG2D signaling pathway converts CTL into lymphokine-activated killer cells in celiac disease. *Immunity* 21, 357-366.

Merril, C.R., Goldman, D., Sedman, S.A., and Ebert, M.H. (1981). Ultrasensitive stain for proteins in polyacrylamide gels shows regional variation in cerebrospinal fluid proteins. *Science* 211, 1437-1438.

Michel, L., Berthelot, L., Pettre, S., Wiertlewski, S., Lefrere, F., Braudeau, C., Brouard, S., Souliou, J.P., and Laplaud, D.A. (2008). Patients with relapsing-remitting multiple sclerosis have normal Treg function when cells expressing IL-7 receptor alpha-chain are excluded from the analysis. *J Clin Invest* 118, 3411-3419.

Mikita, J., Dubourdiu-Cassagno, N., Deloire, M.S., Vekris, A., Biran, M., Raffard, G., Brochet, B., Canron, M.H., Franconi, J.M., Boiziau, C., *et al.* (2011). Altered M1/M2 activation patterns of monocytes in severe relapsing experimental rat model of multiple sclerosis. Amelioration of clinical status by M2 activated monocyte administration. *Mult Scler* 17, 2-15.

Miller, E. (2012). Multiple sclerosis. *Advances in experimental medicine and biology* 724, 222-238.

Miller, S.D., Karpus, W.J., and Davidson, T.S. (2010). Experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse. *Curr Protoc Immunol Chapter 15*, Unit 15 11.

Milner, C.M., and Campbell, R.D. (2001). Genetic organization of the human MHC class III region. *Front Biosci* 6, D914-926.

Milo, R., and Kahana, E. (2010). Multiple sclerosis: geoepidemiology, genetics and the environment. *Autoimmun Rev* 9, A387-394.

Mistry, A.R., and O'Callaghan, C.A. (2007). Regulation of ligands for the activating receptor NKG2D. *Immunology* 121, 439-447.

Mittrucker, H.W., Visekruna, A., and Huber, M. (2014). Heterogeneity in the differentiation and function of CD8(+) T cells. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 62, 449-458.

Mix, E., Meyer-Rienecker, H., Hartung, H.P., and Zettl, U.K. (2010). Animal models of multiple sclerosis--potentials and limitations. *Prog Neurobiol* 92, 386-404.

Miyazaki, Y., Miyake, S., Chiba, A., Lantz, O., and Yamamura, T. (2011). Mucosal-associated invariant T cells regulate Th1 response in multiple sclerosis. *Int Immunol* 23, 529-535.

Mohammad, M.G., Tsai, V.W., Ruitenber, M.J., Hassanpour, M., Li, H., Hart, P.H., Breit, S.N., Sawchenko, P.E., and Brown, D.A. (2014). Immune cell trafficking from the brain maintains CNS immune tolerance. *J Clin Invest* 124, 1228-1241.

Monteyne, P., Van Antwerpen, M.P., and Sindic, C.J. (1999). Expression of costimulatory molecules and cytokines in CSF and peripheral blood mononuclear cells from multiple sclerosis patients. *Acta Neurol Belg* 99, 11-20.

Morandi, B., Mortara, L., Chiossone, L., Accolla, R.S., Mingari, M.C., Moretta, L., Moretta, A., and Ferlazzo, G. (2012). Dendritic cell editing by activated natural killer cells results in a more protective cancer-specific immune response. *PLoS One* 7, e39170.

Morelli, A.E., and Thomson, A.W. (2007). Tolerogenic dendritic cells and the quest for transplant tolerance. *Nat Rev Immunol* 7, 610-621.

Moreno, M., Bannerman, P., Ma, J., Guo, F., Miers, L., Soulika, A.M., and Pleasure, D. (2014). Conditional ablation of astroglial CCL2 suppresses CNS accumulation of M1 macrophages and preserves axons in mice with MOG peptide EAE. *J Neurosci* 34, 8175-8185.

Moretta, L., Ferlazzo, G., Mingari, M.C., Melioli, G., and Moretta, A. (2003). Human natural killer cell function and their interactions with dendritic cells. *Vaccine* 21 Suppl 2, S38-42.

Morgan, B.P., Marchbank, K.J., Longhi, M.P., Harris, C.L., and Gallimore, A.M. (2005). Complement: central to innate immunity and bridging to adaptive responses. *Immunol Lett* 97, 171-179.

Mosser, D.M. (2003). The many faces of macrophage activation. *J Leukoc Biol* 73, 209-212.

Mullen, R.J., Buck, C.R., and Smith, A.M. (1992). NeuN, a neuronal specific nuclear protein in vertebrates. *Development* 116, 201-211.

Multiple Sclerosis International Federation (2013). Atlas of MS 2013, M.S.I. Federation, ed. (http://www.msif.org/includes/documents/cm_docs/2013/m/msif-atlas-of-ms-2013-report.pdf?f=1).

- Muntasell, A., Magri, G., Pende, D., Angulo, A., and Lopez-Botet, M. (2010). Inhibition of NKG2D expression in NK cells by cytokines secreted in response to human cytomegalovirus infection. *Blood* *115*, 5170-5179.
- Murphy, A.C., Lalor, S.J., Lynch, M.A., and Mills, K.H. (2010). Infiltration of Th1 and Th17 cells and activation of microglia in the CNS during the course of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Brain Behav Immun* *24*, 641-651.
- Murray, P.D., Pavelko, K.D., Leibowitz, J., Lin, X., and Rodriguez, M. (1998). CD4(+) and CD8(+) T cells make discrete contributions to demyelination and neurologic disease in a viral model of multiple sclerosis. *J Virol* *72*, 7320-7329.
- Nachmani, D., Stern-Ginossar, N., Sarid, R., and Mandelboim, O. (2009). Diverse herpesvirus microRNAs target the stress-induced immune ligand MICB to escape recognition by natural killer cells. *Cell Host Microbe* *5*, 376-385.
- 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*, 1037-1048.
- Nakagawa, Y., and Chiba, K. (2014). Role of microglial m1/m2 polarization in relapse and remission of psychiatric disorders and diseases. *Pharmaceuticals* *7*, 1028-1048.
- Nakayama, M. (2014). Antigen Presentation by MHC-Dressed Cells. *Front Immunol* *5*, 672.
- Nausch, N., Florin, L., Hartenstein, B., Angel, P., Schorpp-Kistner, M., and Cerwenka, A. (2006). Cutting edge: the AP-1 subunit JunB determines NK cell-mediated target cell killing by regulation of the NKG2D-ligand RAE-1epsilon. *J Immunol* *176*, 7-11.
- Nave, K.A. (2010). Myelination and support of axonal integrity by glia. *Nature* *468*, 244-252.
- Nave, K.A., and Werner, H.B. (2014). Myelination of the nervous system: mechanisms and functions. *Annu Rev Cell Dev Biol* *30*, 503-533.
- Neefjes, J., Jongasma, M.L., Paul, P., and Bakke, O. (2011). Towards a systems understanding of MHC class I and MHC class II antigen presentation. *Nat Rev Immunol* *11*, 823-836.
- Netea, M.G., Joosten, L.A., Latz, E., Mills, K.H., Natoli, G., Stunnenberg, H.G., O'Neill, L.A., and Xavier, R.J. (2016). Trained immunity: A program of innate immune memory in health and disease. *Science* *352*, aaf1098.

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

Nice, T.J., Coscoy, L., and Raulet, D.H. (2009). Posttranslational regulation of the NKG2D ligand Mult1 in response to cell stress. *J Exp Med* 206, 287-298.

Nice, T.J., Deng, W., Coscoy, L., and Raulet, D.H. (2010). Stress-regulated targeting of the NKG2D ligand Mult1 by a membrane-associated RING-CH family E3 ligase. *J Immunol* 185, 5369-5376.

Nicholson, L.B., Greer, J.M., Sobel, R.A., Lees, M.B., and Kuchroo, V.K. (1995). An altered peptide ligand mediates immune deviation and prevents autoimmune encephalomyelitis. *Immunity* 3, 397-405.

Nicholson, L.B., and Kuchroo, V.K. (1996). Manipulation of the Th1/Th2 balance in autoimmune disease. *Curr Opin Immunol* 8, 837-842.

Nielsen, M.M., Witherden, D.A., and Havran, W.L. (2017). gammadelta T cells in homeostasis and host defence of epithelial barrier tissues. *Nat Rev Immunol* 17, 733-745.

Nomura, M., Zou, Z., Joh, T., Takihara, Y., Matsuda, Y., and Shimada, K. (1996). Genomic structures and characterization of Rae1 family members encoding GPI-anchored cell surface proteins and expressed predominantly in embryonic mouse brain. *J Biochem* 120, 987-995.

O'Callaghan, C.A., Cerwenka, A., Willcox, B.E., Lanier, L.L., and Bjorkman, P.J. (2001). Molecular competition for NKG2D: H60 and RAE1 compete unequally for NKG2D with dominance of H60. *Immunity* 15, 201-211.

O'Connor, P., Wolinsky, J.S., Confavreux, C., Comi, G., Kappos, L., Olsson, T.P., Benzerdjeb, H., Truffinet, P., Wang, L., Miller, A., *et al.* (2011). Randomized trial of oral teriflunomide for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 365, 1293-1303.

Ochoa-Reparaz, J., Mielcarz, D.W., Ditrio, L.E., Burroughs, A.R., Foureau, D.M., Haque-Begum, S., and Kasper, L.H. (2009). Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 183, 6041-6050.

Ochoa-Reparaz, J., Mielcarz, D.W., Wang, Y., Begum-Haque, S., Dasgupta, S., Kasper, D.L., and Kasper, L.H. (2010). A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol* 3, 487-495.

Ogasawara, K., Hamerman, J.A., Ehrlich, L.R., Bour-Jordan, H., Santamaria, P., Bluestone, J.A., and Lanier, L.L. (2004). NKG2D blockade prevents autoimmune diabetes in NOD mice. *Immunity* 20, 757-767.

Olivares-Villagomez, D., Wang, Y., and Lafaille, J.J. (1998). Regulatory CD4(+) T cells expressing endogenous T cell receptor chains protect myelin basic protein-specific transgenic mice from spontaneous autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 188, 1883-1894.

Oliver-De la Cruz, J., and Ayuso-Sacido, A. (2012). Neural Stem Cells from Mammalian Brain: Isolation Protocols and Maintenance Conditions. In *Neural Stem Cells and Therapy*, T. Sun, ed. (In Tech), pp. 3-30.

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, 311-318.

Orbelyan, G.A., Tang, F., Sally, B., Solus, J., Meresse, B., Ciszewski, C., Grenier, J.C., Barreiro, L.B., Lanier, L.L., and Jabri, B. (2014). Human NKG2E is expressed and forms an intracytoplasmic complex with CD94 and DAP12. *J Immunol* 193, 610-616.

Ota, K., Matsui, M., Milford, E.L., Mackin, G.A., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (1990). T-cell recognition of an immunodominant myelin basic protein epitope in multiple sclerosis. *Nature* 346, 183-187.

Ousman, S.S., and Kubes, P. (2012). Immune surveillance in the central nervous system. *Nature neuroscience* 15, 1096-1101.

Palay, S.L., and Palade, G.E. (1955). The fine structure of neurons. *J Biophys Biochem Cytol* 1, 69-88.

Panchision, D.M., Chen, H.L., Pistollato, F., Papini, D., Ni, H.T., and Hawley, T.S. (2007). Optimized flow cytometric analysis of central nervous system tissue reveals novel functional relationships among cells expressing CD133, CD15, and CD24. *Stem cells* 25, 1560-1570.

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

Panitch, H.S., Hirsch, R.L., Schindler, J., and Johnson, K.P. (1987b). Treatment of multiple sclerosis with gamma interferon: exacerbations associated with activation of the immune system. *Neurology* 37, 1097-1102.

- Paolicelli, R.C., Bolasco, G., Pagani, F., Maggi, L., Scianni, M., Panzanelli, P., Giustetto, M., Ferreira, T.A., Guiducci, E., Dumas, L., *et al.* (2011). Synaptic pruning by microglia is necessary for normal brain development. *Science* 333, 1456-1458.
- Park, Y.P., Choi, S.C., Kiesler, P., Gil-Krzewska, A., Borrego, F., Weck, J., Krzewski, K., and Coligan, J.E. (2011). Complex regulation of human NKG2D-DAP10 cell surface expression: opposing roles of the gammac cytokines and TGF-beta1. *Blood* 118, 3019-3027.
- Parker, D.C. (1993). T cell-dependent B cell activation. *Annu Rev Immunol* 11, 331-360.
- Parkhurst, C.N., Yang, G., Ninan, I., Savas, J.N., Yates, J.R., 3rd, Lafaille, J.J., Hempstead, B.L., Littman, D.R., and Gan, W.B. (2013). Microglia promote learning-dependent synapse formation through brain-derived neurotrophic factor. *Cell* 155, 1596-1609.
- Paschen, A., Sucker, A., Hill, B., Moll, I., Zapatka, M., Nguyen, X.D., Sim, G.C., Gutmann, I., Hassel, J., Becker, J.C., *et al.* (2009). Differential clinical significance of individual NKG2D ligands in melanoma: soluble ULBP2 as an indicator of poor prognosis superior to S100B. *Clin Cancer Res* 15, 5208-5215.
- Pelletier, D., and Hafler, D.A. (2012). Fingolimod for multiple sclerosis. *N Engl J Med* 366, 339-347.
- Pende, D., Rivera, P., Marcenaro, S., Chang, C.C., Biassoni, R., Conte, R., Kubin, M., Cosman, D., Ferrone, S., Moretta, L., *et al.* (2002). Major histocompatibility complex class I-related chain A and UL16-binding protein expression on tumor cell lines of different histotypes: analysis of tumor susceptibility to NKG2D-dependent natural killer cell cytotoxicity. *Cancer Res* 62, 6178-6186.
- Perry, V.H. (1994). Modulation of microglia phenotype. *Neuropathol Appl Neurobiol* 20, 177.
- Pertoft, H., Laurent, T.C., Laas, T., and Kagedal, L. (1978). Density gradients prepared from colloidal silica particles coated by polyvinylpyrrolidone (Percoll). *Analytical biochemistry* 88, 271-282.
- Peru, R.L., Mandrycky, N., Nait-Oumesmar, B., and Lu, Q.R. (2008). Paving the axonal highway: from stem cells to myelin repair. *Stem Cell Rev* 4, 304-318.
- Peterson, J.W., Bo, L., Mork, S., Chang, A., and Trapp, B.D. (2001). Transected neurites, apoptotic neurons, and reduced inflammation in cortical multiple sclerosis lesions. *Ann Neurol* 50, 389-400.

- Pfeiffer, S.E., Warrington, A.E., and Bansal, R. (1993). The oligodendrocyte and its many cellular processes. *Trends Cell Biol* 3, 191-197.
- Phares, T.W., Ramakrishna, C., Parra, G.I., Epstein, A., Chen, L., Atkinson, R., Stohlman, S.A., and Bergmann, C.C. (2009). Target-dependent B7-H1 regulation contributes to clearance of central nervous system infection and dampens morbidity. *J Immunol* 182, 5430-5438.
- Pierson, E., Simmons, S.B., Castelli, L., and Goverman, J.M. (2012). Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity. *Immunol Rev* 248, 205-215.
- Pierson, E.R., Stromnes, I.M., and Goverman, J.M. (2014). B cells promote induction of experimental autoimmune encephalomyelitis by facilitating reactivation of T cells in the central nervous system. *J Immunol* 192, 929-939.
- Pino, P.A., and Cardona, A.E. (2011). Isolation of brain and spinal cord mononuclear cells using percoll gradients. *Journal of visualized experiments : JoVE*, pii: 2348.
- Piotrowski, P., Lianeri, M., Olesinska, M., and Jagodzinski, P.P. (2012). Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with systemic lupus erythematosus. *Mol Biol Rep* 39, 1343-1347.
- Pittet, C.L., Newcombe, J., Antel, J.P., and Arbour, N. (2011). The majority of infiltrating CD8 T lymphocytes in multiple sclerosis lesions is insensitive to enhanced PD-L1 levels on CNS cells. *Glia* 59, 841-856.
- Poggi, A., Prevosto, C., Massaro, A.M., Negrini, S., Urbani, S., Pierri, I., Saccardi, R., Gobbi, M., and Zocchi, M.R. (2005). Interaction between human NK cells and bone marrow stromal cells induces NK cell triggering: role of NKp30 and NKG2D receptors. *J Immunol* 175, 6352-6360.
- Politis, M., Giannetti, P., Su, P., Turkheimer, F., Keihaninejad, S., Wu, K., Waldman, A., Malik, O., Matthews, P.M., Reynolds, R., *et al.* (2012). Increased PK11195 PET binding in the cortex of patients with MS correlates with disability. *Neurology* 79, 523-530.
- Pollock, R.A., Chandran, V., Pellett, F.J., Thavaneswaran, A., Eder, L., Barrett, J., Rahman, P., Farewell, V., and Gladman, D.D. (2013). The functional MICA-129 polymorphism is associated with skin but not joint manifestations of psoriatic disease independently of HLA-B and HLA-C. *Tissue Antigens* 82, 43-47.
- Polman, C.H., and Killestein, J. (2006). Anti-myelin antibodies in multiple sclerosis: clinically useful? *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 77, 712.

- Polman, C.H., O'Connor, P.W., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Miller, D.H., Phillips, J.T., Lublin, F.D., Giovannoni, G., Wajgt, A., *et al.* (2006). A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N Engl J Med* 354, 899-910.
- Polman, C.H., Reingold, S.C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J.A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., *et al.* (2011). Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69, 292-302.
- 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, 374-389.
- Radosavljevic, M., Cuillerier, B., Wilson, M.J., Clement, O., Wicker, S., Gilfillan, S., Beck, S., Trowsdale, J., and Bahram, S. (2002). A cluster of ten novel MHC class I related genes on human chromosome 6q24.2-q25.3. *Genomics* 79, 114-123.
- 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, 261-281.
- Ranck, J.B., Jr. (1975). Which elements are excited in electrical stimulation of mammalian central nervous system: a review. *Brain Res* 98, 417-440.
- Ransohoff, R.M. (2012). Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line. *Nat Neurosci* 15, 1074-1077.
- Ransohoff, R.M., and Cardona, A.E. (2010). The myeloid cells of the central nervous system parenchyma. *Nature* 468, 253-262.
- Ransohoff, R.M., and Estes, M.L. (1991). Astrocyte expression of major histocompatibility complex gene products in multiple sclerosis brain tissue obtained by stereotactic biopsy. *Arch Neurol* 48, 1244-1246.
- Ransohoff, R.M., and Perry, V.H. (2009). Microglial physiology: unique stimuli, specialized responses. *Annu Rev Immunol* 27, 119-145.
- Raphael, I., Nalawade, S., Eagar, T.N., and Forsthuber, T.G. (2014). T cell subsets and their signature cytokines in autoimmune and inflammatory diseases. *Cytokine pii: S1043-4666(14)00539-0*.
- Rathmell, J.C., Cooke, M.P., Ho, W.Y., Grein, J., Townsend, S.E., Davis, M.M., and Goodnow, C.C. (1995). CD95 (Fas)-dependent elimination of self-reactive B cells upon interaction with CD4+ T cells. *Nature* 376, 181-184.

Raulet, D.H., Gasser, S., Gowen, B.G., Deng, W., and Jung, H. (2013). Regulation of ligands for the NKG2D activating receptor. *Annu Rev Immunol* 31, 413-441.

Rebmann, V., Schutt, P., Brandhorst, D., Opalka, B., Moritz, T., Nowrousian, M.R., and Grosse-Wilde, H. (2007). Soluble MICA as an independent prognostic factor for the overall survival and progression-free survival of multiple myeloma patients. *Clin Immunol* 123, 114-120.

Reboldi, A., Coisne, C., Baumjohann, D., Benvenuto, F., Bottinelli, D., Lira, S., Uccelli, A., Lanzavecchia, A., Engelhardt, B., and Sallusto, F. (2009). C-C chemokine receptor 6-regulated entry of TH-17 cells into the CNS through the choroid plexus is required for the initiation of EAE. *Nat Immunol* 10, 514-523.

Reddy, J., Illes, Z., Zhang, X., Encinas, J., Pyrdol, J., Nicholson, L., Sobel, R.A., Wucherpfennig, K.W., and Kuchroo, V.K. (2004). Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101, 15434-15439.

Redmond, S.A., Mei, F., Eshed-Eisenbach, Y., Osso, L.A., Leshkowitz, D., Shen, Y.A., Kay, J.N., Aurrand-Lions, M., Lyons, D.A., Peles, E., *et al.* (2016). Somatodendritic Expression of JAM2 Inhibits Oligodendrocyte Myelination. *Neuron* 91, 824-836.

Remington, L.T., Babcock, A.A., Zehntner, S.P., and Owens, T. (2007). Microglial recruitment, activation, and proliferation in response to primary demyelination. *Am J Pathol* 170, 1713-1724.

Rep, M.H., van Oosten, B.W., Roos, M.T., Ader, H.J., Polman, C.H., and van Lier, R.A. (1997). Treatment with depleting CD4 monoclonal antibody results in a preferential loss of circulating naive T cells but does not affect IFN-gamma secreting TH1 cells in humans. *J Clin Invest* 99, 2225-2231.

Rivers, T.M., Sprunt, D.H., and Berry, G.P. (1933). Observations on Attempts to Produce Acute Disseminated Encephalomyelitis in Monkeys. *J Exp Med* 58, 39-53.

Roberts, A.I., Lee, L., Schwarz, E., Groh, V., Spies, T., Ebert, E.C., and Jabri, B. (2001). NKG2D receptors induced by IL-15 costimulate CD28-negative effector CTL in the tissue microenvironment. *J Immunol* 167, 5527-5530.

Robinson, A.P., Rodgers, J.M., Goings, G.E., and Miller, S.D. (2014). Characterization of oligodendroglial populations in mouse demyelinating disease using flow cytometry: clues for MS pathogenesis. *PLoS one* 9, e107649.

- Rock, K.L., York, I.A., and Goldberg, A.L. (2004). Post-proteasomal antigen processing for major histocompatibility complex class I presentation. *Nat Immunol* 5, 670-677.
- Rodriguez-Pinto, D. (2005). B cells as antigen presenting cells. *Cell Immunol* 238, 67-75.
- Romagnani, S. (1997). The Th1/Th2 paradigm. *Immunol Today* 18, 263-266.
- Romagnani, S. (2006). Immunological tolerance and autoimmunity. *Intern Emerg Med* 1, 187-196.
- Rompasuk, A.V., Romphruk, A., Naruse, T.K., Raroengjai, S., Puapairoj, C., Inoko, H., and Leelayuwat, C. (2009). Polymorphisms of NKG2D ligands: diverse RAET1/ULBP genes in northeastern Thais. *Immunogenetics* 61, 611-617.
- Roncarolo, M.G., Bacchetta, R., Bordignon, C., Narula, S., and Levings, M.K. (2001). Type 1 T regulatory cells. *Immunol Rev* 182, 68-79.
- Ronchi, F., Basso, C., Preite, S., Reboldi, A., Baumjohann, D., Perlini, L., Lanzavecchia, A., and Sallusto, F. (2016). Experimental priming of encephalitogenic Th1/Th17 cells requires pertussis toxin-driven IL-1beta production by myeloid cells. *Nat Commun* 7, 11541.
- Rosenblum, M.D., Remedios, K.A., and Abbas, A.K. (2015). Mechanisms of human autoimmunity. *J Clin Invest* 125, 2228-2233.
- Ross, C., Clemmesen, K.M., Svenson, M., Sorensen, P.S., Koch-Henriksen, N., Skovgaard, G.L., and Bendtzen, K. (2000). Immunogenicity of interferon-beta in multiple sclerosis patients: influence of preparation, dosage, dose frequency, and route of administration. Danish Multiple Sclerosis Study Group. *Ann Neurol* 48, 706-712.
- Roszak, A., Lianeri, M., and Jagodzinski, P.P. (2012). Prevalence of the NKG2D Thr72Ala polymorphism in patients with cervical carcinoma. *Genet Test Mol Biomarkers* 16, 841-845.
- Routes, J.M., Ryan, S., Morris, K., Takaki, R., Cerwenka, A., and Lanier, L.L. (2005). Adenovirus serotype 5 E1A sensitizes tumor cells to NKG2D-dependent NK cell lysis and tumor rejection. *J Exp Med* 202, 1477-1482.
- Roy, A., Liu, X., and Pahan, K. (2007). Myelin basic protein-primed T cells induce neurotrophins in glial cells via alphavbeta3 [corrected] integrin. *J Biol Chem* 282, 32222-32232.
- Rubio, J.P., Bahlo, M., Stankovich, J., Burfoot, R.K., Johnson, L.J., Huxtable, S., Butzkueven, H., Lin, L., Taylor, B.V., Speed, T.P., *et al.* (2007). Analysis of extended HLA haplotypes in

multiple sclerosis and narcolepsy families confirms a predisposing effect for the class I region in Tasmanian MS patients. *Immunogenetics* 59, 177-186.

Ruck, T., Bittner, S., Gross, C.C., Breuer, J., Albrecht, S., Korr, S., Gobel, K., Pankratz, S., Henschel, C.M., Schwab, N., *et al.* (2013). CD4+NKG2D+ T cells exhibit enhanced migratory and encephalitogenic properties in neuroinflammation. *PLoS One* 8, e81455.

Rumah, K.R., Linden, J., Fischetti, V.A., and Vartanian, T. (2013). Isolation of *Clostridium perfringens* type B in an individual at first clinical presentation of multiple sclerosis provides clues for environmental triggers of the disease. *PloS one* 8, e76359.

Saikali, P., Antel, J.P., Newcombe, J., Chen, Z., Freedman, M., Blain, M., Cayrol, R., Prat, A., Hall, J.A., and Arbour, N. (2007). NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis. *J Neurosci* 27, 1220-1228.

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

Salem, M., Mony, J.T., Lobner, M., Khorooshi, R., and Owens, T. (2011). Interferon regulatory factor-7 modulates experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Journal of neuroinflammation* 8, 181.

Salgado, A.J., Sousa, J.C., Costa, B.M., Pires, A.O., Mateus-Pinheiro, A., Teixeira, F.G., Pinto, L., and Sousa, N. (2015). Mesenchymal stem cells secretome as a modulator of the neurogenic niche: basic insights and therapeutic opportunities. *Front Cell Neurosci* 9, 249.

Salih, H.R., Antropius, H., Gieseke, F., Lutz, S.Z., Kanz, L., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2003). Functional expression and release of ligands for the activating immunoreceptor NKG2D in leukemia. *Blood* 102, 1389-1396.

Salih, H.R., Rammensee, H.G., and Steinle, A. (2002). Cutting edge: down-regulation of MICA on human tumors by proteolytic shedding. *J Immunol* 169, 4098-4102.

Sallusto, F., Geginat, J., and Lanzavecchia, A. (2004). Central memory and effector memory T cell subsets: function, generation, and maintenance. *Annu Rev Immunol* 22, 745-763.

Salter, M.W., and Stevens, B. (2017). Microglia emerge as central players in brain disease. *Nat Med* 23, 1018-1027.

Samarakoon, A., Chu, H., and Malarkannan, S. (2009). Murine NKG2D ligands: "double, double toil and trouble". *Mol Immunol* 46, 1011-1019.

Sauer, B.M., Schmalstieg, W.F., and Howe, C.L. (2013). Axons are injured by antigen-specific CD8(+) T cells through a MHC class I- and granzyme B-dependent mechanism. *Neurobiol Dis* 59, 194-205.

Saura, J., Tusell, J.M., and Serratoso, J. (2003). High-yield isolation of murine microglia by mild trypsinization. *Glia* 44, 183-189.

Sawcer, S., Franklin, R.J., and Ban, M. (2014). Multiple sclerosis genetics. *Lancet Neurol* 13, 700-709.

Saxena, A., Bauer, J., Scheikl, T., Zappulla, J., Audebert, M., Desbois, S., Waisman, A., Lassmann, H., Liblau, R.S., and Mars, L.T. (2008). Cutting edge: Multiple sclerosis-like lesions induced by effector CD8 T cells recognizing a sequestered antigen on oligodendrocytes. *J Immunol* 181, 1617-1621.

Schneider-Hohendorf, T., Rossaint, J., Mohan, H., Boning, D., Breuer, J., Kuhlmann, T., Gross, C.C., Flanagan, K., Sorokin, L., Vestweber, D., *et al.* (2014). VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. *J Exp Med* 211, 1833-1846.

Schneider-Hohendorf, T., Stenner, M.P., Weidenfeller, C., Zozulya, A.L., Simon, O.J., Schwab, N., and Wiendl, H. (2010). Regulatory T cells exhibit enhanced migratory characteristics, a feature impaired in patients with multiple sclerosis. *Eur J Immunol* 40, 3581-3590.

Seboun, E., Robinson, M.A., Doolittle, T.H., Ciulla, T.A., Kindt, T.J., and Hauser, S.L. (1989). A susceptibility locus for multiple sclerosis is linked to the T cell receptor beta chain complex. *Cell* 57, 1095-1100.

Seddiki, N., Santner-Nanan, B., Martinson, J., Zaunders, J., Sasson, S., Landay, A., Solomon, M., Selby, W., Alexander, S.I., Nanan, R., *et al.* (2006). Expression of interleukin (IL)-2 and IL-7 receptors discriminates between human regulatory and activated T cells. *J Exp Med* 203, 1693-1700.

Sedel, F., Bechade, C., Vyas, S., and Triller, A. (2004). Macrophage-derived tumor necrosis factor alpha, an early developmental signal for motoneuron death. *J Neurosci* 24, 2236-2246.

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. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88, 7438-7442.

Segal, B.M., Constantinescu, C.S., Raychaudhuri, A., Kim, L., Fidelus-Gort, R., Kasper, L.H., and Ustekinumab, M.S.I. (2008). Repeated subcutaneous injections of IL12/23 p40 neutralising antibody, ustekinumab, in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase II, double-blind, placebo-controlled, randomised, dose-ranging study. *Lancet Neurol* 7, 796-804.

Sharief, M.K., and Thompson, E.J. (1993). Correlation of interleukin-2 and soluble interleukin-2 receptor with clinical activity of multiple sclerosis. *J Neurol Neurosurg Psychiatry* 56, 169-174.

Sharpe, M., and Mount, N. (2015). Genetically modified T cells in cancer therapy: opportunities and challenges. *Dis Model Mech* 8, 337-350.

Sherman, D.L., and Brophy, P.J. (2005). Mechanisms of axon ensheathment and myelin growth. *Nat Rev Neurosci* 6, 683-690.

Shevach, E.M., and Thornton, A.M. (2014). tTregs, pTregs, and iTregs: similarities and differences. *Immunol Rev* 259, 88-102.

Shinohara, M.L., Kim, J.H., Garcia, V.A., and Cantor, H. (2008). Engagement of the type I interferon receptor on dendritic cells inhibits T helper 17 cell development: role of intracellular osteopontin. *Immunity* 29, 68-78.

Sinha, S., Itani, F.R., and Karandikar, N.J. (2014). Immune regulation of multiple sclerosis by CD8+ T cells. *Immunol Res* 59, 254-265.

Siren, J., Sareneva, T., Pirhonen, J., Strengell, M., Veckman, V., Julkunen, I., and Matikainen, S. (2004). Cytokine and contact-dependent activation of natural killer cells by influenza A or Sendai virus-infected macrophages. *J Gen Virol* 85, 2357-2364.

Sitkovsky, M.V. (2009). T regulatory cells: hypoxia-adenosinergic suppression and re-direction of the immune response. *Trends Immunol* 30, 102-108.

Skaper, S.D., Facci, L., Zusso, M., and Giusti, P. (2018). An Inflammation-Centric View of Neurological Disease: Beyond the Neuron. *Frontiers in cellular neuroscience* 12, 72.

Skihar, V., Silva, C., Chojnacki, A., Doring, A., Stallcup, W.B., Weiss, S., and Yong, V.W. (2009). Promoting oligodendrogenesis and myelin repair using the multiple sclerosis medication glatiramer acetate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 17992-17997.

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. *Proc Natl Acad Sci U S A* *101*, 2428-2433.

Smyth, M.J., Swann, J., Kelly, J.M., Cretney, E., Yokoyama, W.M., Diefenbach, A., Sayers, T.J., and Hayakawa, Y. (2004). NKG2D recognition and perforin effector function mediate effective cytokine immunotherapy of cancer. *J Exp Med* *200*, 1325-1335.

Snyder, S.H. (2009). Neurotransmitters, receptors, and second messengers galore in 40 years. *J Neurosci* *29*, 12717-12721.

Sofroniew, M.V. (2014). Astrogliosis. *Cold Spring Harb Perspect Biol* *7*, a020420.

Sokoloff, L. (1977). Relation between physiological function and energy metabolism in the central nervous system. *J Neurochem* *29*, 13-26.

Sommer, I., and Schachner, M. (1981). Monoclonal antibodies (O1 to O4) to oligodendrocyte cell surfaces: an immunocytological study in the central nervous system. *Developmental biology* *83*, 311-327.

Sonderegger, I., Kisielow, J., Meier, R., King, C., and Kopf, M. (2008). IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *Eur J Immunol* *38*, 1833-1838.

Song, H., Stevens, C.F., and Gage, F.H. (2002). Astroglia induce neurogenesis from adult neural stem cells. *Nature* *417*, 39-44.

Springer, T., Galfre, G., Secher, D.S., and Milstein, C. (1979). Mac-1: a macrophage differentiation antigen identified by monoclonal antibody. *European journal of immunology* *9*, 301-306.

Starr, T.K., Jameson, S.C., and Hogquist, K.A. (2003). Positive and negative selection of T cells. *Annu Rev Immunol* *21*, 139-176.

Stephens, H.A. (2001). MICA and MICB genes: can the enigma of their polymorphism be resolved? *Trends Immunol* *22*, 378-385.

Stern-Ginossar, N., Elefant, N., Zimmermann, A., Wolf, D.G., Saleh, N., Biton, M., Horwitz, E., Prokocimer, Z., Prichard, M., Hahn, G., *et al.* (2007). Host immune system gene targeting by a viral miRNA. *Science* *317*, 376-381.

Stern-Ginossar, N., Gur, C., Biton, M., Horwitz, E., Elboim, M., Stanietsky, N., Mandelboim, M., and Mandelboim, O. (2008). Human microRNAs regulate stress-induced immune responses mediated by the receptor NKG2D. *Nat Immunol* 9, 1065-1073.

Stone, J.D., Chervin, A.S., and Kranz, D.M. (2009). T-cell receptor binding affinities and kinetics: impact on T-cell activity and specificity. *Immunology* 126, 165-176.

Stoolman, J.S., Duncker, P.C., Huber, A.K., and Segal, B.M. (2014). Site-specific chemokine expression regulates central nervous system inflammation and determines clinical phenotype in autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 193, 564-570.

Stork, T., Engelen, D., Krudewig, A., Silies, M., Bainton, R.J., and Klambt, C. (2008). Organization and function of the blood-brain barrier in *Drosophila*. *J Neurosci* 28, 587-597.

Strachan-Whaley, M., Rivest, S., and Yong, V.W. (2014). Interactions between microglia and T cells in multiple sclerosis pathobiology. *J Interferon Cytokine Res* 34, 615-622.

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

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

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

Strong, R.K. (2002). Asymmetric ligand recognition by the activating natural killer cell receptor NKG2D, a symmetric homodimer. *Mol Immunol* 38, 1029-1037.

Strunk, T., Bubel, S., Mascher, B., Schlenke, P., Kirchner, H., and Wandinger, K.P. (2000). Increased numbers of CCR5+ interferon-gamma- and tumor necrosis factor-alpha-secreting T lymphocytes in multiple sclerosis patients. *Ann Neurol* 47, 269-273.

Stumhofer, J.S., Silver, J.S., Laurence, A., Porrett, P.M., Harris, T.H., Turka, L.A., Ernst, M., Saris, C.J., O'Shea, J.J., and Hunter, C.A. (2007). Interleukins 27 and 6 induce STAT3-mediated T cell production of interleukin 10. *Nat Immunol* 8, 1363-1371.

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

Suarez-Alvarez, B., Lopez-Vazquez, A., Gonzalez, M.Z., Fdez-Morera, J.L., Diaz-Molina, B., Blanco-Gelaz, M.A., Pascual, D., Martinez-Borra, J., Muro, M., Alvarez-Lopez, M.R., *et al.* (2007). The relationship of anti-MICA antibodies and MICA expression with heart allograft rejection. *Am J Transplant* 7, 1842-1848.

Sullivan, L.C., Clements, C.S., Beddoe, T., Johnson, D., Hoare, H.L., Lin, J., Huyton, T., Hopkins, E.J., Reid, H.H., Wilce, M.C., *et al.* (2007). The heterodimeric assembly of the CD94-NKG2 receptor family and implications for human leukocyte antigen-E recognition. *Immunity* 27, 900-911.

Sun, D., Wang, X., Zhang, H., Deng, L., and Zhang, Y. (2011). MMP9 mediates MICA shedding in human osteosarcomas. *Cell Biol Int* 35, 569-574.

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, 7579-7587.

Sun, J.B., Olsson, T., Wang, W.Z., Xiao, B.G., Kostulas, V., Fredrikson, S., Ekre, H.P., and Link, H. (1991). Autoreactive T and B cells responding to myelin proteolipid protein in multiple sclerosis and controls. *Eur J Immunol* 21, 1461-1468.

Sweeney, C.M., Lonergan, R., Basdeo, S.A., Kinsella, K., Dungan, L.S., Higgins, S.C., Kelly, P.J., Costelloe, L., Tubridy, N., Mills, K.H., *et al.* (2011). IL-27 mediates the response to IFN-beta therapy in multiple sclerosis patients by inhibiting Th17 cells. *Brain, behavior, and immunity* 25, 1170-1181.

Takada, A., Yoshida, S., Kajikawa, M., Miyatake, Y., Tomaru, U., Sakai, M., Chiba, H., Maenaka, K., Kohda, D., Fugo, K., *et al.* (2008). Two novel NKG2D ligands of the mouse H60 family with differential expression patterns and binding affinities to NKG2D. *J Immunol* 180, 1678-1685.

Takahama, Y. (2006). Journey through the thymus: stromal guides for T-cell development and selection. *Nat Rev Immunol* 6, 127-135.

Takata, K., Kinoshita, M., Okuno, T., Moriya, M., Kohda, T., Honorat, J.A., Sugimoto, T., Kumanogoh, A., Kayama, H., Takeda, K., *et al.* (2011). The lactic acid bacterium *Pediococcus acidilactici* suppresses autoimmune encephalomyelitis by inducing IL-10-producing regulatory T cells. *PloS one* 6, e27644.

Talbot, P.J., Paquette, J.S., Ciurli, C., Antel, J.P., and Ouellet, F. (1996). Myelin basic protein and human coronavirus 229E cross-reactive T cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* 39, 233-240.

Tamaki, S., Kawakami, M., Ishitani, A., Kawashima, W., Kasuda, S., Yamanaka, Y., Shimomura, H., Imai, Y., Nakagawa, Y., Hatake, K., *et al.* (2010). Soluble MICB serum levels correlate with disease stage and survival rate in patients with oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 30, 4097-4101.

Tanaka, T., and Yoshida, S. (2014). Mechanisms of remyelination: recent insight from experimental models. *Biomol Concepts* 5, 289-298.

Tang, F., Sally, B., Ciszewski, C., Abadie, V., Curran, S.A., Groh, V., Fitzgerald, O., Winchester, R.J., and Jabri, B. (2013). Interleukin 15 primes natural killer cells to kill via NKG2D and cPLA2 and this pathway is active in psoriatic arthritis. *PLoS One* 8, e76292.

Tang, F., Sally, B., Lesko, K., Discepolo, V., Abadie, V., Ciszewski, C., Semrad, C., Guandalini, S., Kupfer, S.S., and Jabri, B. (2015). Cysteinyl leukotrienes mediate lymphokine killer activity induced by NKG2D and IL-15 in cytotoxic T cells during celiac disease. *J Exp Med* 212, 1487-1495.

Tangye, S.G., Ferguson, A., Avery, D.T., Ma, C.S., and Hodgkin, P.D. (2002). Isotype switching by human B cells is division-associated and regulated by cytokines. *J Immunol* 169, 4298-4306.

Tato, C.M., and O'Shea, J.J. (2006). Immunology: what does it mean to be just 17? *Nature* 441, 166-168.

Taveggia, C., Thaker, P., Petrylak, A., Caporaso, G.L., Toews, A., Falls, D.L., Einheber, S., and Salzer, J.L. (2008). Type III neuregulin-1 promotes oligodendrocyte myelination. *Glia* 56, 284-293.

Tennakoon, D.K., Mehta, R.S., Ortega, S.B., Bhoj, V., Racke, M.K., and Karandikar, N.J. (2006). Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8+ T cells in multiple sclerosis. *J Immunol* 176, 7119-7129.

Terada, L.S., and Liu, Z. (2014). Aiolos and Lymphocyte Mimicry in Lung Cancer. *Mol Cell Oncol* 1, e29912.

Textor, S., Fiegler, N., Arnold, A., Porgador, A., Hofmann, T.G., and Cerwenka, A. (2011). Human NK cells are alerted to induction of p53 in cancer cells by upregulation of the NKG2D ligands ULBP1 and ULBP2. *Cancer Res* 71, 5998-6009.

Tieng, V., Le Bouguenec, C., du Merle, L., Bertheau, P., Desreumaux, P., Janin, A., Charron, D., and Toubert, A. (2002). Binding of Escherichia coli adhesin AfaE to CD55 triggers cell-surface expression of the MHC class I-related molecule MICA. *Proc Natl Acad Sci U S A* 99, 2977-2982.

- Tokumoto, Y.M., Tang, D.G., and Raff, M.C. (2001). Two molecularly distinct intracellular pathways to oligodendrocyte differentiation: role of a p53 family protein. *EMBO J* 20, 5261-5268.
- Tokuyama, M., Lorin, C., Delebecque, F., Jung, H., Raulet, D.H., and Coscoy, L. (2011). Expression of the RAE-1 family of stimulatory NK-cell ligands requires activation of the PI3K pathway during viral infection and transformation. *PLoS Pathog* 7, e1002265.
- Tong, X., Ao, Y., Faas, G.C., Nwaobi, S.E., Xu, J., Hausteiner, M.D., Anderson, M.A., Mody, I., Olsen, M.L., Sofroniew, M.V., *et al.* (2014). Astrocyte Kir4.1 ion channel deficits contribute to neuronal dysfunction in Huntington's disease model mice. *Nat Neurosci* 17, 694-703.
- Torkildsen, O., Brunborg, L.A., Myhr, K.M., and Bo, L. (2008). The cuprizone model for demyelination. *Acta Neurol Scand Suppl* 188, 72-76.
- Totoiu, M.O., and Keirstead, H.S. (2005). Spinal cord injury is accompanied by chronic progressive demyelination. *J Comp Neurol* 486, 373-383.
- Traynelis, S.F., Wollmuth, L.P., McBain, C.J., Menniti, F.S., Vance, K.M., Ogden, K.K., Hansen, K.B., Yuan, H., Myers, S.J., and Dingledine, R. (2010). Glutamate receptor ion channels: structure, regulation, and function. *Pharmacol Rev* 62, 405-496.
- Treanor, B. (2012). B-cell receptor: from resting state to activate. *Immunology* 136, 21-27.
- Treiner, E., Duban, L., Bahram, S., Radosavljevic, M., Wanner, V., Tilloy, F., Affaticati, P., Gilfillan, S., and Lantz, O. (2003). Selection of evolutionarily conserved mucosal-associated invariant T cells by MR1. *Nature* 422, 164-169.
- Tremblay, M.E., Lowery, R.L., and Majewska, A.K. (2010). Microglial interactions with synapses are modulated by visual experience. *PLoS Biol* 8, e1000527.
- Tullman, M.J. (2013). A review of current and emerging therapeutic strategies in multiple sclerosis. *Am J Manag Care* 19, S21-27.
- Tuohy, V.K., and Kinkel, R.P. (2000). Epitope spreading: a mechanism for progression of autoimmune disease. *Arch Immunol Ther Exp (Warsz)* 48, 347-351.
- Tzartos, J.S., Friese, M.A., Craner, M.J., Palace, J., Newcombe, J., Esiri, M.M., and Fugger, L. (2008). Interleukin-17 production in central nervous system-infiltrating T cells and glial cells is associated with active disease in multiple sclerosis. *Am J Pathol* 172, 146-155.

Upshaw, J.L., Arneson, L.N., Schoon, R.A., Dick, C.J., Billadeau, D.D., and Leibson, P.J. (2006). NKG2D-mediated signaling requires a DAP10-bound Grb2-Vav1 intermediate and phosphatidylinositol-3-kinase in human natural killer cells. *Nat Immunol* 7, 524-532.

Van Belle, T.L., Ling, E., Haase, C., Bresson, D., Urso, B., and von Herrath, M.G. (2013). NKG2D blockade facilitates diabetes prevention by antigen-specific Tregs in a virus-induced model of diabetes. *J Autoimmun* 40, 66-73.

van Noort, J.M., van den Elsen, P.J., van Horssen, J., Geurts, J.J., van der Valk, P., and Amor, S. (2011). Preactive multiple sclerosis lesions offer novel clues for neuroprotective therapeutic strategies. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 10, 68-81.

van Oosten, B.W., Lai, M., Hodgkinson, S., Barkhof, F., Miller, D.H., Moseley, I.F., Thompson, A.J., Rudge, P., McDougall, A., McLeod, J.G., *et al.* (1997). Treatment of multiple sclerosis with the monoclonal anti-CD4 antibody cM-T412: results of a randomized, double-blind, placebo-controlled, MR-monitored phase II trial. *Neurology* 49, 351-357.

van Zwam, M., Huizinga, R., Heijmans, N., van Meurs, M., Wierenga-Wolf, A.F., Melief, M.J., Hintzen, R.Q., t Hart, B.A., Amor, S., Boven, L.A., *et al.* (2009a). Surgical excision of CNS-draining lymph nodes reduces relapse severity in chronic-relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Pathol* 217, 543-551.

van Zwam, M., Huizinga, R., Melief, M.J., Wierenga-Wolf, A.F., van Meurs, M., Voerman, J.S., Biber, K.P., Boddeke, H.W., Hopken, U.E., Meisel, C., *et al.* (2009b). Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE. *J Mol Med (Berl)* 87, 273-286.

Vance, R.E., Jamieson, A.M., and Raulet, D.H. (1999). Recognition of the class Ib molecule Qa-1(b) by putative activating receptors CD94/NKG2C and CD94/NKG2E on mouse natural killer cells. *J Exp Med* 190, 1801-1812.

Vance, R.E., Kraft, J.R., Altman, J.D., Jensen, P.E., and Raulet, D.H. (1998). Mouse CD94/NKG2A is a natural killer cell receptor for the nonclassical major histocompatibility complex (MHC) class I molecule Qa-1(b). *J Exp Med* 188, 1841-1848.

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

Vanderlugt, C.L., Neville, K.L., Nikcevich, K.M., Eagar, T.N., Bluestone, J.A., and Miller, S.D. (2000). Pathologic role and temporal appearance of newly emerging autoepitopes in relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 164, 670-678.

Vandevyver, C., Mertens, N., van den Elsen, P., Medaer, R., Raus, J., and Zhang, J. (1995). Clonal expansion of myelin basic protein-reactive T cells in patients with multiple sclerosis: restricted T cell receptor V gene rearrangements and CDR3 sequence. *Eur J Immunol* 25, 958-968.

Vasanthakumar, A., and Kallies, A. (2013). IL-27 paves different roads to Tr1. *Eur J Immunol* 43, 882-885.

Vasek, M.J., Garber, C., Dorsey, D., Durrant, D.M., Bollman, B., Soung, A., Yu, J., Perez-Torres, C., Frouin, A., Wilton, D.K., *et al.* (2016). A complement-microglial axis drives synapse loss during virus-induced memory impairment. *Nature* 534, 538-543.

Vella, A.T., Mitchell, T., Groth, B., Linsley, P.S., Green, J.M., Thompson, C.B., Kappler, J.W., and Marrack, P. (1997). CD28 engagement and proinflammatory cytokines contribute to T cell expansion and long-term survival in vivo. *J Immunol* 158, 4714-4720.

Venkataraman, G.M., Suci, D., Groh, V., Boss, J.M., and Spies, T. (2007). Promoter region architecture and transcriptional regulation of the genes for the MHC class I-related chain A and B ligands of NKG2D. *J Immunol* 178, 961-969.

Venken, K., Hellings, N., Broekmans, T., Hensen, K., Rummens, J.L., and Stinissen, P. (2008). Natural naive CD4⁺CD25⁺CD127^{low} regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression. *J Immunol* 180, 6411-6420.

Verneris, M.R., Karimi, M., Baker, J., Jayaswal, A., and Negrin, R.S. (2004). Role of NKG2D signaling in the cytotoxicity of activated and expanded CD8⁺ T cells. *Blood* 103, 3065-3072.

Viglietta, V., Baecher-Allan, C., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (2004). Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* 199, 971-979.

Villares, R., Cadenas, V., Lozano, M., Almonacid, L., Zaballos, A., Martinez, A.C., and Varona, R. (2009). CCR6 regulates EAE pathogenesis by controlling regulatory CD4⁺ T-cell recruitment to target tissues. *Eur J Immunol* 39, 1671-1681.

Vollmer, T.L., Wynn, D.R., Alam, M.S., and Valdes, J. (2011). A phase 2, 24-week, randomized, placebo-controlled, double-blind study examining the efficacy and safety of an anti-interleukin-12 and -23 monoclonal antibody in patients with relapsing-remitting or secondary progressive multiple sclerosis. *Mult Scler* 17, 181-191.

von Andrian, U.H., and Mackay, C.R. (2000). T-cell function and migration. Two sides of the same coin. *N Engl J Med* 343, 1020-1034.

Wada, H., Matsumoto, N., Maenaka, K., Suzuki, K., and Yamamoto, K. (2004). The inhibitory NK cell receptor CD94/NKG2A and the activating receptor CD94/NKG2C bind the top of HLA-E through mostly shared but partly distinct sets of HLA-E residues. *Eur J Immunol* 34, 81-90.

Wake, H., Moorhouse, A.J., Jinno, S., Kohsaka, S., and Nabekura, J. (2009). Resting microglia directly monitor the functional state of synapses in vivo and determine the fate of ischemic terminals. *J Neurosci* 29, 3974-3980.

Walker, L.S., and Abbas, A.K. (2002). The enemy within: keeping self-reactive T cells at bay in the periphery. *Nat Rev Immunol* 2, 11-19.

Walsh, K.B., Lanier, L.L., and Lane, T.E. (2008). NKG2D receptor signaling enhances cytolytic activity by virus-specific CD8+ T cells: evidence for a protective role in virus-induced encephalitis. *J Virol* 82, 3031-3044.

Watts, C. (2004). The exogenous pathway for antigen presentation on major histocompatibility complex class II and CD1 molecules. *Nat Immunol* 5, 685-692.

Weaver, A., Goncalves da Silva, A., Nuttall, R.K., Edwards, D.R., Shapiro, S.D., Rivest, S., and Yong, V.W. (2005). An elevated matrix metalloproteinase (MMP) in an animal model of multiple sclerosis is protective by affecting Th1/Th2 polarization. *FASEB J* 19, 1668-1670.

Wegner, C., Esiri, M.M., Chance, S.A., Palace, J., and Matthews, P.M. (2006). Neocortical neuronal, synaptic, and glial loss in multiple sclerosis. *Neurology* 67, 960-967.

Wei, P., Xu, L., Li, C.D., Sun, F.D., Chen, L., Tan, T., and Luo, S.Z. (2014). Molecular dynamic simulation of the self-assembly of DAP12-NKG2C activating immunoreceptor complex. *PLoS One* 9, e105560.

Weinger, J.G., Plaisted, W.C., Maciejewski, S.M., Lanier, L.L., Walsh, C.M., and Lane, T.E. (2014). Activating receptor NKG2D targets RAE-1-expressing allogeneic neural precursor cells in a viral model of multiple sclerosis. *Stem Cells* 32, 2690-2701.

Whitacre, C.C., Reingold, S.C., and O'Looney, P.A. (1999). A gender gap in autoimmunity. *Science* 283, 1277-1278.

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, 3223-3227.

Williams, K., Ulvestad, E., and Antel, J.P. (1994). B7/BB-1 antigen expression on adult human microglia studied in vitro and in situ. *Eur J Immunol* *24*, 3031-3037.

Williams, P.A., Tribble, J.R., Pepper, K.W., Cross, S.D., Morgan, B.P., Morgan, J.E., John, S.W., and Howell, G.R. (2016). Inhibition of the classical pathway of the complement cascade prevents early dendritic and synaptic degeneration in glaucoma. *Mol Neurodegener* *11*, 26.

Willing, A., and Friese, M.A. (2012). CD8-mediated inflammatory central nervous system disorders. *Curr Opin Neurol* *25*, 316-321.

Willing, A., Leach, O.A., Ufer, F., Attfield, K.E., Steinbach, K., Kursawe, N., Piedavent, M., and Friese, M.A. (2014). CD8(+) MAIT cells infiltrate into the CNS and alterations in their blood frequencies correlate with IL-18 serum levels in multiple sclerosis. *Eur J Immunol* *44*, 3119-3128.

Winkler, E.A., Bell, R.D., and Zlokovic, B.V. (2011). Lack of Smad or Notch leads to a fatal game of brain pericyte hopscotch. *Dev Cell* *20*, 279-280.

Włodarczyk, A., Lobner, M., Cedile, O., and Owens, T. (2014). Comparison of microglia and infiltrating CD11c(+) cells as antigen presenting cells for T cell proliferation and cytokine response. *J Neuroinflammation* *11*, 57.

Wolburg, H., and Lippoldt, A. (2002). Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation. *Vascul Pharmacol* *38*, 323-337.

Wolf, H.K., Buslei, R., Schmidt-Kastner, R., Schmidt-Kastner, P.K., Pietsch, T., Wiestler, O.D., and Blumcke, I. (1996). NeuN: a useful neuronal marker for diagnostic histopathology. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society* *44*, 1167-1171.

Wong, A.D., Ye, M., Levy, A.F., Rothstein, J.D., Bergles, D.E., and Searson, P.C. (2013). The blood-brain barrier: an engineering perspective. *Front Neuroeng* *6*, 7.

Wong, D., and Dorovini-Zis, K. (1992). Upregulation of intercellular adhesion molecule-1 (ICAM-1) expression in primary cultures of human brain microvessel endothelial cells by cytokines and lipopolysaccharide. *J Neuroimmunol* *39*, 11-21.

Wong, D., and Dorovini-Zis, K. (1995). Expression of vascular cell adhesion molecule-1 (VCAM-1) by human brain microvessel endothelial cells in primary culture. *Microvasc Res* *49*, 325-339.

Wong, P., and Pamer, E.G. (2003). CD8 T cell responses to infectious pathogens. *Annu Rev Immunol* 21, 29-70.

Wu, G.F., and Alvarez, E. (2011). The immunopathophysiology of multiple sclerosis. *Neurol Clin* 29, 257-278.

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, 2278-2286.

Wu, J., Song, Y., Bakker, A.B., Bauer, S., Spies, T., Lanier, L.L., and Phillips, J.H. (1999). An activating immunoreceptor complex formed by NKG2D and DAP10. *Science* 285, 730-732.

Wucherpfennig, K.W., and Strominger, J.L. (1995). Molecular mimicry in T cell-mediated autoimmunity: viral peptides activate human T cell clones specific for myelin basic protein. *Cell* 80, 695-705.

Wulff, H., Calabresi, P.A., Allie, R., Yun, S., Pennington, M., Beeton, C., and Chandy, K.G. (2003). The voltage-gated Kv1.3 K(+) channel in effector memory T cells as new target for MS. *J Clin Invest* 111, 1703-1713.

Xia, M., Guerra, N., Sukhova, G.K., Yang, K., Miller, C.K., Shi, G.P., Raulet, D.H., and Xiong, N. (2011). Immune activation resulting from NKG2D/ligand interaction promotes atherosclerosis. *Circulation* 124, 2933-2943.

Xing, Y., and Hogquist, K.A. (2012). T-cell tolerance: central and peripheral. *Cold Spring Harb Perspect Biol* 4.

Yamamoto, K., Fujiyama, Y., Andoh, A., Bamba, T., and Okabe, H. (2001). Oxidative stress increases MICA and MICB gene expression in the human colon carcinoma cell line (CaCo-2). *Biochim Biophys Acta* 1526, 10-12.

Yi, J.J., and Ehlers, M.D. (2005). Ubiquitin and protein turnover in synapse function. *Neuron* 47, 629-632.

Young, K.M., Psachoulia, K., Tripathi, R.B., Dunn, S.J., Cossell, L., Attwell, D., Tohyama, K., and Richardson, W.D. (2013). Oligodendrocyte dynamics in the healthy adult CNS: evidence for myelin remodeling. *Neuron* 77, 873-885.

Yu, M., Johnson, J.M., and Tuohy, V.K. (1996). A predictable sequential determinant spreading cascade invariably accompanies progression of experimental autoimmune encephalomyelitis: a basis for peptide-specific therapy after onset of clinical disease. *J Exp Med* 183, 1777-1788.

Yu, P., Bamford, R.N., and Waldmann, T.A. (2014). IL-15-dependent CD8⁺ CD122⁺ T cells ameliorate experimental autoimmune encephalomyelitis by modulating IL-17 production by CD4⁺ T cells. *Eur J Immunol* *44*, 3330-3341.

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

Zalc, B., Goujet, D., and Colman, D. (2008). The origin of the myelination program in vertebrates. *Curr Biol* *18*, R511-512.

Zamanian, J.L., Xu, L., Foo, L.C., Nouri, N., Zhou, L., Giffard, R.G., and Barres, B.A. (2012). Genomic analysis of reactive astrogliosis. *J Neurosci* *32*, 6391-6410.

Zang, Y.C., Li, S., Rivera, V.M., Hong, J., Robinson, R.R., Breitbach, W.T., Killian, J., and Zhang, J.Z. (2004). Increased CD8⁺ cytotoxic T cell responses to myelin basic protein in multiple sclerosis. *J Immunol* *172*, 5120-5127.

Zatorre, R.J., Fields, R.D., and Johansen-Berg, H. (2012). Plasticity in gray and white: neuroimaging changes in brain structure during learning. *Nat Neurosci* *15*, 528-536.

Zhang, B., Gaiteri, C., Bodea, L.G., Wang, Z., McElwee, J., Podtelezchnikov, A.A., Zhang, C., Xie, T., Tran, L., Dobrin, R., *et al.* (2013). Integrated systems approach identifies genetic nodes and networks in late-onset Alzheimer's disease. *Cell* *153*, 707-720.

Zhang, C., Zhang, J., Niu, J., Zhou, Z., Zhang, J., and Tian, Z. (2008). Interleukin-12 improves cytotoxicity of natural killer cells via upregulated expression of NKG2D. *Hum Immunol* *69*, 490-500.

Zhang, J., Markovic-Plese, S., Lacet, B., Raus, J., Weiner, H.L., and Hafler, D.A. (1994). Increased frequency of interleukin 2-responsive T cells specific for myelin basic protein and proteolipid protein in peripheral blood and cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis. *J Exp Med* *179*, 973-984.

Zhu, J., Yamane, H., and Paul, W.E. (2010). Differentiation of effector CD4 T cell populations (*). *Annu Rev Immunol* *28*, 445-489.