HAL
open science

Imagerie par résonnance magnétique moléculaire et inflammation des barrières biologiques dans les modèles de sclérose en plaques

Antoine Fournier

To cite this version:

Antoine Fournier. Imagerie par résonnance magnétique moléculaire et inflammation des barrières biologiques dans les modèles de sclérose en plaques. Médecine humaine et pathologie. Normandie Université, 2017. Français. NNT : 2017NORMC410 . tel-01870716

HAL Id: tel-01870716

https://theses.hal.science/tel-01870716

Submitted on 9 Sep 2018

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

Normandie Université

THESE

Pour obtenir le diplôme de doctorat

Spécialité Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

Préparée au sein de l'Université Caen Normandie

Imagerie par résonance magnétique moléculaire et inflammation des barrières biologiques dans les modèles de sclérose en plaques

Présentée et soutenue par
Antoine Fournier

Thèse soutenue publiquement le 08/09/2017 devant le jury composé de		
Pr. Jean-Philippe Ranjeva	PU / UMR AMU CNRS 7339 / Aix-Marseille Université	Rapporteur
Dr. Axel Montagne	Assistant professor / Zilkha Neurogenetic Institute / University of Southern California	Rapporteur
Dr. Laure Michel	PH / CHU Nantes / Université de Nantes	Examinateur
Pr. Pierre-Olivier Couraud	DR / UMR-S Inserm U1016 / Institut Cochin / Université Paris Descartes	Examinateur
Pr. Carine Ali	PU / UMR-S Inserm U1237 / Université Caen Normandie	Examinateur
Pr. Gilles Defer	PU-PH / UMR-S Inserm U1237 / CHU Caen / Université Caen Normandie	Examinateur
Dr. Richard Macrez	UMR-S Inserm U1237 / CHU Caen / Université Caen Normandie	Examinateur
Dr. Fabian Docagne	CR / UMR-S Inserm U1237 / Université Caen Normandie	Directeur de thèse

Thèse dirigée par le Dr. Fabian Docagne, UMR-S Inserm U1237

UNIVERSITÉ CAEN NORMANDIE

EdNBISE
Ecole doctorale Normande Biologie Intégrative, Santé, Environnement

PhIND
PHYSIOPATHOLOGY & IMAGING OF NEUROLOGICAL DISORDERS

Remerciements

Mes premiers remerciements vont à Fabian Docagne qui a encadré mon travail de thèse. Durant toutes ces années, il m'a fait confiance, et m'a permis de travailler avec autonomie. Merci de m'avoir guidé, de m'avoir soutenu et d'avoir fortement contribué à mon épanouissement scientifique.

Merci beaucoup à Richard Macrez, qui a officieusement co-encadré cette thèse avec une grande disponibilité malgré son activité clinique. Il a toujours été là pour moi quand c'était nécessaire, et je l'en remercie.

Je tiens également à remercier Maxime Gauberti pour ses connaissances qui m'ont été d'une grande aide durant cette thèse. Ce travail n'aurait pas pu être possible sans son expertise.

Merci également à toutes les personnes qui ont contribué, de prêt ou de loin à ce travail et particulièrement Claudine, Sara, Camille et Aurélien.

Merci à Denis Vivien, de m'avoir ouvert les portes de son unité, et de nous permettre à tous de mener nos recherches dans des conditions exceptionnelles.

Je remercie chaleureusement mes rapporteurs de thèse, le Pr Jean-Philippe Ranjeva et le Dr Axel Montagne d'avoir accepté et pris le temps d'évaluer ce travail.

Je remercie également le Dr Laure Michel, Le Dr Pierre-Olivier Couraud, le Pr Carine Ali et le Pr Gilles Defer pour leur expertise et leur présence au sein du jury.

Je tiens à remercier vivement toute l'unité U1237, pour leur accueil, leur esprit d'équipe, et leur bonne humeur.

Un énorme merci à ma famille pour avoir toujours cru en moi. Merci à mon oncle Frédéric, qui a accepté de relire cette thèse.

Enfin, merci Granville !

Résumé

L'élaboration de nouvelles stratégies pour la détection de l'activité de la sclérose en plaques (SEP) est importante pour améliorer le diagnostic et le suivi de cette pathologie. Pour cela, nous avons utilisé des microparticules d'oxyde de fer (MPIO) couplées à un anticorps spécifique de la protéine P-sélectine ou de MAdCAM-1. Durant cette thèse, nous avons démontré que l'IRM moléculaire spécifique de la P-sélectine est capable de détecter les événements pathologiques qui se déroulent dans la moelle épinière de modèles murins de SEP chronique et récurrente-rémittente. De façon intéressante, nous montrons ici que cette technique d'IRM peut prédire l'apparition des poussées et des récupérations dans l'EAE. De plus, nous avons démontré que l'IRM moléculaire de MAdCAM-1 est capable de détecter l'inflammation intestinale dans des modèles de pathologies intestinales et de SEP. Les techniques novatrices d'IRM développées dans cette étude pourraient apporter de nouvelles avancées dans le diagnostic et le pronostic des rechutes de la SEP en ciblant l'activation vasculaire. Enfin, nous rapportons dans la dernière partie de cette thèse que le système glymphatique existe également dans le parenchyme de la moelle épinière de la souris. Dans l'EAE, l'activité de ce système est réduite dans la moelle épinière mais pas dans le cerveau ou le cervelet. Cette altération est associée à l'accumulation de cellules inflammatoires dans l'espace péri-vasculaire, à la désorganisation de l'AQP4 et entraine une forte augmentation du volume ventriculaire. Ces perturbations pourraient contribuer à la physiopathologie de la SEP. Nos résultats sont très prometteurs pour l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques.

Mots clés : sclérose en plaques, EAE, P-sélectine, MAdCAM-1, IRM, MPIO, Système Glymphatique

Summary

Developing new strategies to detect disease activity in multiple sclerosis (MS) is essential to improve the diagnosis and follow-up of this pathology. To this aim, we used microparticles of iron oxide (MPIO) coupled to an antibody specific to the P-selectin or MAdCAM-1 protein. In this thesis, we establish that molecular MRI specific to P-selectin protein is able to detect the pathological events that take place in the spinal cord of chronic and relapsing-remitting models of MS in mice. Interestingly, we show here that this MRI technique can predict the apparition of relapses and recoveries in EAE. Moreover, we demonstrate that MRI specific to MAdCAM-1 protein is able to detect the gut inflammation that takes place in models of bowel diseases or MS. The innovative MRI techniques developed in this study could bring new advances in the diagnosis and prognosis of MS relapses by targeting gut inflammation. In the last part of this work, we report that the glymphatic system also exists in the spinal cord parenchyma of the mouse. In EAE, the activity of this system is reduced in the spinal cord but not in the brain or cerebellum. This alteration is associated to inflammatory cell accumulation within the perivascular space, AQP4 disorganization and leads to a large increase of ventricular volume. These disruptions could contribute to the MS pathophysiology. Our results hold significant promise for the development of new therapeutic strategies.

Key words : Multiple sclerosis, EAE, P-selectin, MAdCAM-1, MRI, MPIO, Glymphatic system

Sommaire

Sommaire 1

Abréviations 4

Index des figures 6

Index des tableaux 8

INTRODUCTION 9

1. Conformation vasculaire du SNC 10

1.1. Généralités 10

1.2. La barrière-hémato encéphalique 11

1.2.1. Définition 11

1.2.2. Histoire 11

1.2.3. Structure 12

1.2.4. Implications dans les pathologies cérébrales 14

1.3. La barrière sang-LCR 15

1.3.1. Histoire 16

1.3.2. Structure et fonction 16

1.4. Le flux de LCR péri-vasculaire : « système glymphatique » 19

1.4.1. Définition 19

1.4.2. Structure et fonction 19

1.4.3. Les techniques utilisées pour étudier le système glymphatique 21

1.4.4. Implications dans les pathologies cérébrales 23

2. La sclérose en plaques 24

2.1. Généralités 24
2.2. Épidémiologie 24
2.3. Les différentes formes de SEP 25
2.4. Physiopathologie de la SEP 27
2.4.1. Généralités 27
2.4.2. Les cellules immunitaires impliquées dans la SEP 29
2.4.2.1. Les Lymphocytes T 29
2.4.2.2. Les lymphocytes B 32
2.4.2.3. Les macrophages et la microglie 32
2.4.2.4. Les neutrophiles 34
2.4.2.5. Les cellules dendritiques 35
2.4.3. Interaction des cellules immunitaires avec la BHE 36
2.4.4. L'hypothèse de l'implication des plexus choroïdes dans la SEP 40
2.4.5. L'hypothèse de l'axe intestin-cerveau 42
2.4.5.1. Similitudes entre la barrière intestinale et la BHE 42
2.4.5.2. Mimétisme moléculaire 44
2.5. Diagnostic de la SEP 45
3. Les outils utilisés dans l'étude de la SEP en recherche préclinique 47
3.1. Les modèles animaux 47
3.1.1. Utilité des modèles animaux 47
3.1.2. Modèles murins 48
3.1.2.1. Modèles viraux 48
3.1.2.2. Les modèles génétiques 48
3.1.2.3. Modèles de démyélinisation par des agents chimiques 49
3.1.2.4. Modèles auto-immuns 51
3.1.3. Autres espèces 52

3.2. L'IRM moléculaire de l'inflammation 54

3.2.1. Principes 54

3.2.2. Utilisation des MPIOs 57

OBJECTIFS 60

RESULTATS 63

Etude 1 : Prédiction de l'activité de la maladie dans les modèles de sclérose en plaques avec l'imagerie par résonance magnétique moléculaire de la P-sélectine 64

Etude 2 : Imagerie moléculaire de l'inflammation intestinale 81

Etude 3 : Une voie péri-vasculaire entraîne la circulation du liquide céphalo-rachidien dans la moelle épinière de la souris et est modifiée dans un modèle de sclérose en plaques ... 97

DISCUSSION 117

1. L'IRM moléculaire de la P-sélectine 119

2. L'IRM moléculaire de l'inflammation intestinale ciblant MAdCAM-1 126

3. Le système glymphatique dans l'EAE 130

Conclusion 132

Autres Travaux 134

Références 177

Abréviations

ACF : Adjuvant Complet de Freund

ALCAM : Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule

AQP-X : Aquaporine-X

ARSEP : fondation pour l'Aide à la Recherche Sur la Sclérose En Plaque

BHE : Barrière Hémato-Encéphalique

BI : Barrière Intestinale

CPA : Cellules présentatrices d'antigène

DSS : Dextran Sodium Sulfate

EAE : Encéphalite Auto-immune Expérimentale

EDSS : Expanded Disability Status Scale

FLAIR : Fluid-attenuated inversion recovery

ICAM-1 : InterCellular Adhesion Molecule-1

IRM : Imagerie par Résonance Magnétique

LB : Lymphocyte B

LCR : Liquide céphalorachidien

LFA-1 : Lymphocyte Function-associated Antigen 1

LPAM : Lymphocyte Peyer patch Adhesion Molecule

LT : Lymphocyte T

Mac-1 : Macrophage integrin-1

MAdCAM-1 : Mucosal vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1

MOG : Glycoprotéine Oligodendrogliale de la Myéline

MPIO : MicroParticle of Iron Oxide

MPO : Myéloperoxydase

PC : Plexus Choroïdes

PECAM-1 : Platelet/Endothelial-Cell Adhesion Molecule-1

PMB : Protéine Basique de la Myéline

PLP : Protéine ProtéoLipidique

PSGL1 : P-Selectin Glycoprotein Ligand-1

RXR : Retinoid-X Receptor

SCI : Syndrome Cliniquement Isolé

SNC : Système Nerveux Central

TCR : Récepteur des Cellules T

TEP : Tomographie par Emission de Positons

USPIO : UltraSmall Particles of Iron Oxide

VCAM-1 : Vascular Cell Adhesion Molecule 1

VLA-4 : Very Late Antigen-4

Index des figures

Figure 1 : **Photo de la surface d'un cerveau humain vivant durant une chirurgie, témoignant de son importante vascularisation.** (Robert Ludlow, UCL Instutute of Neurology, London) . 10

Figure 2 : **Portrait du scientifique Allemand Paul Ehrlich.** 11

Figure 3 : **Structure cellulaire de la barrière hémato-encéphalique** (Obermeier, Daneman and Ransohoff, 2013).. 12

Figure 4 : **Structure des plexus choroïdes** (Demeestere, Libert and Vandenbroucke, 2015). 17

Figure 5 : **Le circuit du LCR dans le cerveau** (Damkier, Brown and Praetorius, 2013)**.** 18

Figure 6 : **Organisation des espaces périvasculaires du cerveau** (Jessen et al., 2015).. 20

Figure 7 : **Organisation du système glymphatique** (Iliff et al., 2012)**.** 21

Figure 8 : **Technique utilisée pour la preuve de concept du système glymphatique** (Jessen et al., 2015). 22

Figure 9 : **IRM du système glymphatique** (Iliff et al., 2013).. 22

Figure 10 : **Hétérogénéité clinique de la SEP**. 26

Figure 11 : **Caractéristiques et dysfonctions retrouvées dans la SEP** (Dendrou, Fugger and Friese, 2015) 28

Figure 12 : **L'infiltration leucocytaire à travers la BHE** (adapté de Ley et al., 2007). 37

Figure 13 : **Hypothèse de l'implication des plexus choroïdes dans la réaction auto-immune rencontrée dans la SEP et ses modèles** (adapté de Ransohoff and Engelhardt, 2012). 41

Figure 14 : **Similitudes physiologiques et pathologiques de la barrière intestinale et de la barrière hémato-encéphalique** (Savidge, Sofroniew and Neunlist, 2007). 43

Figure 15 : **IRM du cerveau d'un patient atteint de SEP** (Filippi et al., 2012). 45

Figure 16 : **IRM sagittale pondérée en T2 de la moelle épinière cervicale d'un patient atteint de SEP** (Salinas-González et al., 2016). 46

Figure 17 : **L'observation de la structure de la myéline au microscope électronique montre la démyélinisation et la remyélinisation des axones dans le corps calleux des souris traitée à la cuprizone** (Matsushima and Morell, 2006) 49

Figure 18 : **Schéma résumant les effets des différents agents de contraste utilisés dans l'IRM moléculaire de l'inflammation (cerveau de rongeur)** (Gauberti et al., 2014)..... 56

Figure 19 : **Evolution de la qualité des images d'IRM moléculaire (cerveaux de souris EAE)** 57
Figure 20 : **Exemple d'IRM moléculaire de VCAM-1 dans le cerveau de modèles de pathologies cérébrales** (Gauberti et al., 2014). 58
Figure 21 : **Figure 20 : La P-sélectine est une cible de choix pour détecter l'activation des cellules endothéliales des PC dans l'EAE** 123
Figure 22 : **L'IRM moléculaire de la P-sélectine révèle une activation des PC deux jours avant l'apparition de l'EAE** 124
Figure 23 : **schéma bilan résumant l'hypothèse de l'implication des PC et du flux de LCR dans la pathophysiologie de l'EAE** 125
Figure 24 : **L'application d'un stress aigu augmente l'incidence des rechutes d'un modèle de SEP récurrente-rémittente** 129

Index des tableaux

Table 1 : **Différences structurelles de la BHE des artérioles, capillaires et veinules** (Bechmann, Galea and Perry, 2007). 14

Table 2 : **Effets délétères ou bénéfiques des différentes cellules immunitaires impliquées dans la pathophysiologie de la SEP.** 36

Table 3 : **Avantage et inconvénients des différents modèles murins utilisés dans l'étude de SEP** 52

INTRODUCTION

1. Conformation vasculaire du SNC

1.1. Généralités

Le système nerveux central (SNC) est constitué de l'encéphale, de la moelle épinière et de la rétine. Ces organes énergivores sont extrêmement vascularisés, afin de permettre un apport sanguin suffisant à leur bon fonctionnement. Ainsi, le débit sanguin cérébral du cerveau est d'environ 50 ml/100g/min, ce qui correspond à 15% du débit cardiaque pour un organe qui ne représente que 2% du poids corporel (Powers *et al.*, 1985). Malgré la vascularisation importante, les échanges entre le sang et le SNC sont étroitement régulés et contrôlés, conférant à ce dernier une protection renforcée par rapport aux autres organes. En effet, les cellules présentes dans le SNC ont besoin d'un milieu extracellulaire stable pour fonctionner normalement et maintenir une bonne transmission nerveuse. Le compartiment sanguin contient quant à lui une grande quantité de molécules et de cellules dont les concentrations peuvent varier au cours du temps en fonction de l'environnement. Ainsi, plusieurs éléments vasculaires sont présents afin d'isoler le SNC du sang pouvant perturber l'homéostasie cérébrale (Abbott *et al.*, 2010). Parmi les spécificités vasculaires du SNC participant à cette protection, la plus connue est très certainement la présence d'une barrière sanguine appelée barrière hémato-encéphalique (BHE). Cependant, d'autres éléments y participent, comme la présence d'une barrière épithéliale entre le sang et le liquide céphalorachidien (LCR) et d'un système d'élimination des déchets spécifiques du SNC. La structure et le fonctionnement de ces trois entités seront détaillés dans cette première partie.

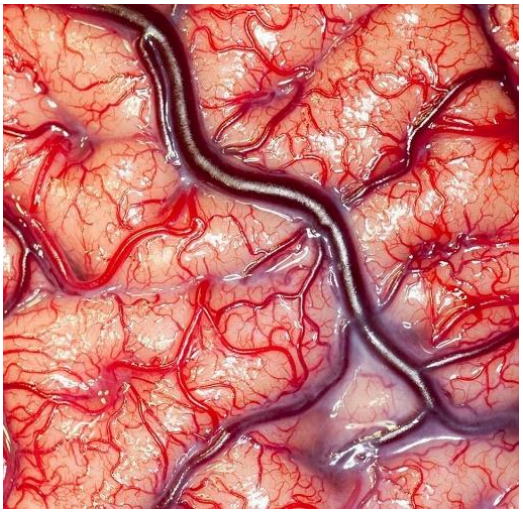


Figure 1 : Photo de la surface d'un cerveau humain vivant durant une chirurgie, témoignant de son importante vascularisation. (Robert Ludlow, UCL Instutute of Neurology, London)

1.2. La barrière-hémato encéphalique

1.2.1. Définition

La BHE est le terme utilisé pour décrire les propriétés uniques que possèdent les vaisseaux sanguins du SNC, à savoir le passage limité et contrôlé des molécules et des cellules à travers la paroi vasculaire.

1.2.2. Histoire

La première mise en évidence du phénomène selon lequel certaines molécules ne peuvent pas atteindre le cerveau après leur injection intraveineuse fut faite par Paul Ehrlich en 1885. Dans son étude ayant pour but de comparer la consommation d'oxygène des différents organes, Ehrlich injecta des colorants dont la couleur change en fonction de leur stade d'oxydoréduction (l'absence de coloration résultant d'une faible oxygénation). Il remarqua que, contrairement aux autres organes, le cerveau n'était que très peu, voire pas du tout coloré (Bechmann, Galea and Perry, 2007). Cependant, il ne pensa pas que ce manque de coloration du cerveau puisse être attribué à des propriétés spéciales des cellules endothéliales du cerveau. Cette idée fut émise peu de temps après par Bield et Kraus (1898), Roux et Borrel (1898) et Lewandowsky (1900) basée sur la comparaison d'injections intrathécales et parentérales d'éléments neurotoxiques (Saunders *et al.*, 2014). Ces éléments qui n'allaient pas dans le sens de son étude sur l'oxygénation des organes, furent sévèrement rejetés par Ehrlich qui est considéré comme le « découvreur réticent » de la BHE, bien qu'il ne soit pas à l'origine du terme « barrière hémato-encéphalique ». Il est aujourd'hui admis que ce terme revient à Lewandowsky, lequel, dans son article de 1900 montre que des toxines sont effectives à une dose 100 fois plus faible *via* leur injection intrathécale que *via* leur injection par voies parentérales. Il expliqua cette différence par le fait que les vaisseaux du cerveau ont des propriétés restrictives à l'égard de certaines molécules. Les premières observations de la structure moléculaire de la BHE furent réalisées bien après, en 1967 grâce à l'utilisation de la microscopie électronique. Les auteurs remarqueront la présence de chevauchements caractéristiques des cellules endothéliales des capillaires du cerveau : les jonctions serrées (Reese and Karnovsky, 1967). De manière intéressante, dans la même étude les auteurs

Figure 2 : Portrait du scientifique Allemand Paul Ehrlich, prix Nobel de physiologie ou médecine en 1908.

noteront la pénurie de vésicules de transport dans les capillaires cérébraux, pénurie qu'ils considéreront comme une autre caractéristique de la BHE.

1.2.3. Structure

Constituée d'un ensemble de cellules, la BHE est présente au niveau des artérioles, des capillaires et des veinules du SNC (Bechmann, Galea and Perry, 2007). Parmi ces cellules, on trouve les cellules endothéliales qui constituent les vaisseaux sanguins et possèdent un phénotype particulier qui consiste en l'expression de jonctions cellulaires étanches appelées jonctions serrées. Autour de ces cellules endothéliales, viennent s'enrouler deux lames basales. La première est constituée de protéines de la matrice extracellulaire produites par les cellules endothéliales et les péricytes alors que la deuxième est produite par les astrocytes. Sur cet ensemble, on retrouve des péricytes (sous les lames basales) ainsi que des pieds astrocytaires permettant le contrôle local de ce phénotype particulier (Daneman, 2012; Obermeier, Daneman and Ransohoff, 2013) (figure 3).

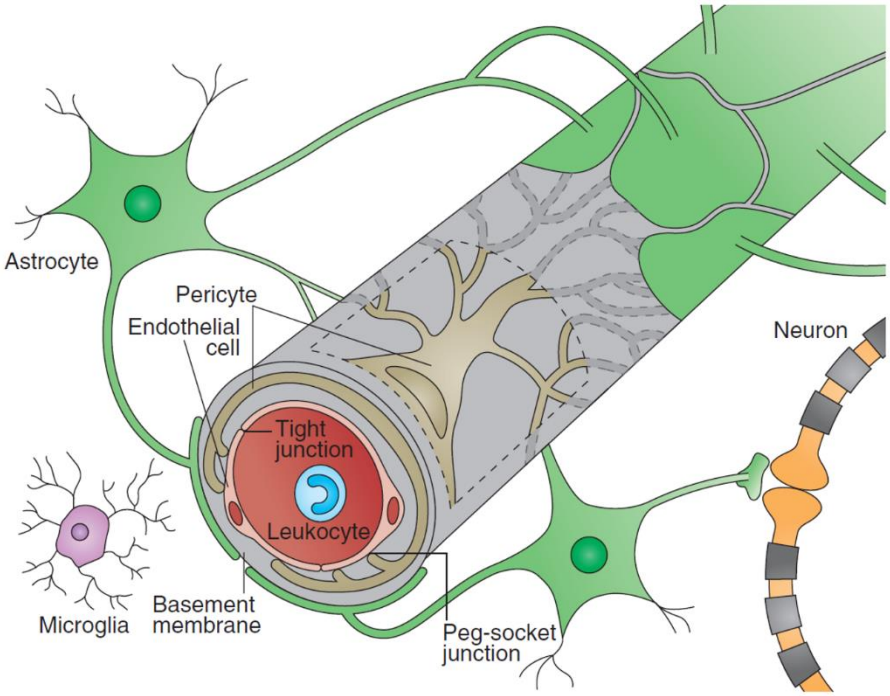


Figure 3 : Structure cellulaire de la barrière hémato-encéphalique (Obermeier, Daneman and Ransohoff, 2013). Les cellules endothéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées, et entourées par les péricytes et les pieds astrocytaires. Deux lames basales sont également présentes entre les pieds astrocytaires et les cellules endothéliales.

Des cellules endothéliales hautement spécialisées : Les cellules endothéliales du SNC sont différentes des cellules endothéliales des tissus non-nerveux. Elles forment des cellules hautement polarisées réunies par des jonctions serrées qui limitent considérablement le passage des ions, des molécules et des cellules de manière paracellulaire. En outre, les cellules endothéliales de la BHE ne présentent que très peu de pinocytose/transcytose, limitant ainsi les passages transcellulaires. En contrepartie, de nombreux transporteurs impliqués dans l'efflux de médiateurs solubles sont exprimés au niveau des cellules endothéliales et permettent l'apport contrôlé de nutriments aux cellules du SNC (Daneman, 2012).

Les lames basales, composants non cellulaires de la BHE : Les lames basales, qui jouent un rôle important dans la stabilité des cellules de la BHE, sont produites par les astrocytes et les péricytes qui sécrètent des molécules de la matrice extracellulaire. Parmi ces molécules, on trouve essentiellement des protéines structurales, comme le collagène IV, la laminine, et la fibronectine. Les deux lames basales, qui ont des compositions différentes, sont bien distinctes au niveau des vaisseaux possédant un espace périvasculaire : on parle ainsi d'une lame basale endothéliale, et d'une lame basale parenchymateuse. Au niveau des vaisseaux ne présentant pas d'espace périvasculaire, une seule lame basale composite est présente. En plus de jouer un rôle stabilisateur, les lames basales jouent également un rôle de barrière physique en limitant le passage des cellules et des molécules à travers la BHE (Daneman, 2012; Obermeier, Daneman and Ransohoff, 2013).

Le rôle des péricytes dans la régulation de la BHE : Les péricytes effectuent diverses tâches, comme le maintien de l'intégrité de la BHE, via le contrôle de l'expression et de l'alignement des jonctions serrées. Ils régulent également l'angiogenèse ainsi que l'architecture et la stabilité vasculaire pendant le développement et le remodelage vasculaire. De plus, ces derniers ont une capacité de clairance des molécules et des débris. En régulant le diamètre des petits vaisseaux, les péricytes ont également la capacité de faire varier le débit sanguin (Daneman *et al.*, 2010; Winkler, Bell and Zlokovic, 2011; Sweeney, Ayyadurai and Zlokovic, 2016).

Le rôle des astrocytes dans la régulation de la BHE : Les astrocytes interagissent avec les cellules endothéliales via leurs prolongements et recouvrent ainsi près de 90% des micro-vaisseaux. En libérant des facteurs solubles, ils contrôlent la spécialisation des cellules endothéliales en cellules de la BHE. L'exemple le plus parlant est le fait qu'en présence

d'astrocytes, les cellules endothéliales en culture présentent un phénotype de barrière (avec expression de jonctions serrées), ce qui n'est pas le cas quand elles sont cultivées seules. En faisant le lien entre les neurones et les cellules endothéliales, les astrocytes servent également de support métabolique en contrôlant le débit sanguin cérébral en fonction de l'activité neuronale(Daneman, 2012; Obermeier, Daneman and Ransohoff, 2013).

Il est important de noter que la structure de la BHE peut différer en fonction des vaisseaux. En effet, la BHE est plus prononcée dans les capillaires que dans les vaisseaux pre- et post-capillaires, comme les artérioles et les veinules. Ces derniers possèdent une densité plus faible de jonctions serrées et la présence d'un espace péri-vasculaire empêche leur contact direct avec les pieds astrocytaires (Ge, Song and Pachter, 2005) (table 1).

Cells and features	Arteriole	Capillary	Venule
Smooth muscle cells	+	–	+
Pericytes	+	+	+
Endothelial tight junctions	N.d.	Belts of tight junctions [5]	Non-specialized
Permeability for BBB markers	N.d.	No	Yes
Intimate contact between astrocytic endfeet and the vascular wall/presence of perivascular spaces	No/yes	Yes/no	No/yes
Perivascular macrophages	+	+	+

a Abbreviations: +, present; –, absent, n.d., not determined.

Table 1 : Différences structurelles de la BHE des artérioles, capillaires et veinules (Bechmann, Galea and Perry, 2007).

1.2.4. Implications dans les pathologies cérébrales

En conditions pathologiques, de nombreux éléments peuvent compromettre l'intégrité de la BHE. En effet, une augmentation anormale de la perméabilité de la BHE peut être provoquée par un stress oxydatif, par la sécrétion de facteurs angiogéniques et de cytokines pro-inflammatoires, par l'adhésion et l'infiltration de cellules immunitaires, mais également par l'infection par un agent pathogène. Ces différents facteurs peuvent conduire à la réduction de l'expression des protéines de jonction serrées, à un détachement des pericytes et des pieds astrocytaires ainsi qu'à l'altération des lames basales. Les conséquences de ces dérégulations sont également multiples, comme la création d'un déséquilibre des ions et des neurotransmetteurs, la fuite des protéines et des toxines plasmatiques, l'activation

microgliale et la sécrétions de cytokines. Il en résulte une inflammation du SNC, une dysfonction neuronale pouvant aller jusqu'à une neuro-dégénération (Obermeier, Daneman and Ransohoff, 2013).

L'altération de la BHE a été observée dans de nombreuses pathologies cérébrales, comme les accidents vasculaires cérébraux (Sandoval and Witt, 2008), la sclérose latérale amyotrophique (Zhong *et al.*, 2008; Henkel *et al.*, 2009), l'épilepsie (Oby and Janigro, 2006), la neuromyélite optique (Shimizu *et al.*, 2012), la maladie d'Alzheimer (Zlokovic, 2008) ou encore la sclérose en plaques (Minagar and Alexander, 2003). Bien que l'altération de la BHE semble être dans la majeure partie des cas une conséquence de la pathologie, il a été montré qu'une augmentation précoce de la perméabilité de la BHE peut être mesurée dans l'hippocampe au cours du vieillissement (Montagne *et al.*, 2015). Cette altération précoce de la BHE pourrait contribuer à la déficience cognitive observée dans la maladie d'Alzheimer.

Bien que la BHE soit présente sur la majorité des micro-vaisseaux du SNC, certains d'entre eux en sont dépourvus. C'est le cas des vaisseaux des plexus choroïdes, dont les structures et fonctions sont détaillées dans la partie qui suit.

1.3. La barrière sang-LCR

Les plexus choroïdes (PC) sont un enlacement de vaisseaux sanguins entourés par une monocouche de cellules épithéliales. Les PC sont présents au niveau de la paroi des ventricules et baignent ainsi dans le LCR. Ces derniers possèdent une variété de fonctions, dont la principale est la production du LCR. Contrairement aux vaisseaux qui forment la BHE, les vaisseaux des PC sont perméables et fenêtrés. À défaut d'avoir un endothélium vasculaire imperméable, les PC possèdent des cellules épithéliales reliées entre elles par des jonctions serrées, formant la barrière entre le sang et le LCR.

1.3.1. Histoire

La structure anatomique des PC a été décrite pour la première fois par Hérophile (330-250 avant JC) qui disséquait des cadavres en publique. En 1664, Willis fut le premier à leur donner une fonction en proposant que les PC fonctionnent comme une glande sécrétant le LCR. Sa théorie a ensuite été soutenue par Luschka en 1855 grâce à l'utilisation de la microscopie. Les plus anciennes traces de l'observation d'une perméabilité différente entre les vaisseaux du parenchyme cérébral et ceux des plexus choroïdes datent de 1913, où Goldmann nota que l'injection de colorant dans la circulation sanguine n'induit pas de coloration du parenchyme cérébral, mais provoque bel et bien une coloration des cellules des PC (Bechmann, Galea and Perry, 2007). Les premiers à parler de « barrière » furent, en 1918, Stern et Gautier qui notèrent que « la barrière qui s'oppose au passage dans le liquide céphalo-rachidien de substances circulant dans le sang présente des différents notables suivant les espèces animales » (Saunders *et al.*, 2014). En 1934, Flexner mesura et compara les composants du sang et du LCR sur des embryons de porc et a noté des différences : le LCR contenait des concentrations plus élevées d'ions chlorure et magnésium, mais des concentrations plus faibles de protéines, d'acide-aminés, de glucose, de calcium, de potassium et d'acide urique. Ces résultats sont les premiers à aller à l'encontre des croyances de l'époque selon lesquelles le LCR n'était qu'un plasma sanguin filtré (Mortazavi *et al.*, 2014). Par la suite, de nombreuses études ont contribué à la compréhension actuelle de la structure et du fonctionnement des PC qui seront détaillés si dessous.

1.3.2. Structure et fonction

Malgré les différences structurelles importantes du SNC entre les espèces, les PC ont une structure et une fonction qui se sont conservées au cours de l'évolution chez les vertébrés. Présents dans les ventricules cérébraux, les PC sont hautement vascularisés et présentent une structure à l'image de leur rôle sécréteur. Ils se composent d'une monocouche de cellules épithéliales cuboïdales qui entourent un stroma composé de tissu conjonctif et de vaisseaux fenêtrés. Ces cellules épithéliales sont reliées entre elles par des jonctions serrées formant la barrière sang-LCR et empêchant le passage passif paracellulaire de molécules indésirables. À l'image de la BHE, on trouve des péricytes entourant les vaisseaux des PC, mais également diverses cellules immunitaires, comme des macrophages périvasculaires. De plus, des cellules présentatrices d'antigène (CPA) sont présentes sur la surface apicale de l'épithélium (appelées

« epiplexus cells » ou cellules de Kolmer) (Ransohoff and Engelhardt, 2012; Demeestere, Libert and Vandenbroucke, 2015; Lun, Monuki and Lehtinen, 2015) (figure 4).

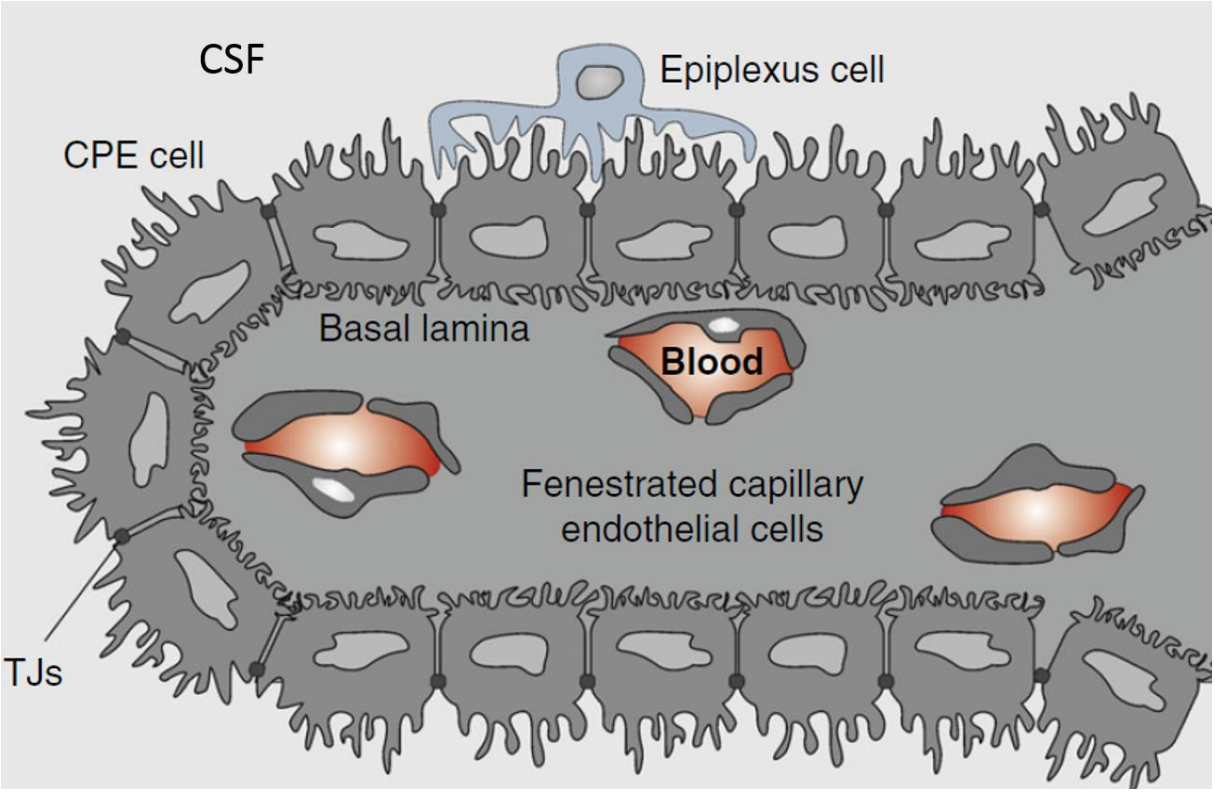


Figure 4 : Structure des plexus choroïdes (Demeestere, Libert and Vandenbroucke, 2015). Les cellules épithéliales sont reliées en elles par des jonctions serrées, entourant le stroma contenant des vaisseaux fenêtrés. CSF= LCR ; CPE cell= cellules de l'épithélium des plexus choroïdes ; TJs= jonctions serrées.

Contrairement à la BHE, la barrière sang-LCR est extrêmement perméable à l'eau grâce à la présence sur sa surface apicale d'un grand nombre de canaux à eau comme l'aquaporine-1 (AQP-1). En accord avec cela, les souris déficientes en AQP-1 voient la perméabilité à l'eau de leur PC diminuée de 80% (Oshio *et al.*, 2005). De plus, les cellules épithéliales possèdent un nombre important de transporteurs d'ions (particulièrement pour le Cl^-, le Na^+ et l'HCO_3^-), provoquant une différence contrôlée d'osmolarité entre le LCR et le stroma. C'est cette différence d'osmolarité qui entraîne les molécules d'eau à travers l'épithélium *via* l'AQP-1. Ainsi, la teneur en eau du LCR dépasse les 99%, quand celle du sang tend vers les 92%. La fenestration des vaisseaux sanguins permet aux cellules épithéliales de se fournir en eau nécessaire à la production du LCR. Pour cela, les PC sont hautement perfusés en sang, à raison de 4 ml/min/gramme de PC, soit environ 10 fois plus que l'apport sanguin du parenchyme cérébral. De toutes les cellules sécrétrices du corps humain, les cellules épithéliales des PC

sont parmi les plus efficaces : 500 à 600 ml de LCR sont produits chaque jour, soit de quoi renouveler plusieurs fois le volume total de LCR du SNC (avoisinant les 150 ml chez l'homme). Cependant, la surface totale estimée des PC est d'environ 0,021m² contre environ 20 m² pour la BHE. Pour pallier cela, les cellules épithéliales présentent des microvillosités, leur permettant d'augmenter par 50 leur surface d'échange (Damkier, Brown and Praetorius, 2013). Une fois produit, le LCR circule dans les ventricules et les espaces sous arachnoïdiens, puis retourne dans la circulation sanguine au niveau des sinus veineux par des villosités sous arachnoïdiennes (ou granulations arachnoïdiennes) (figure 5).

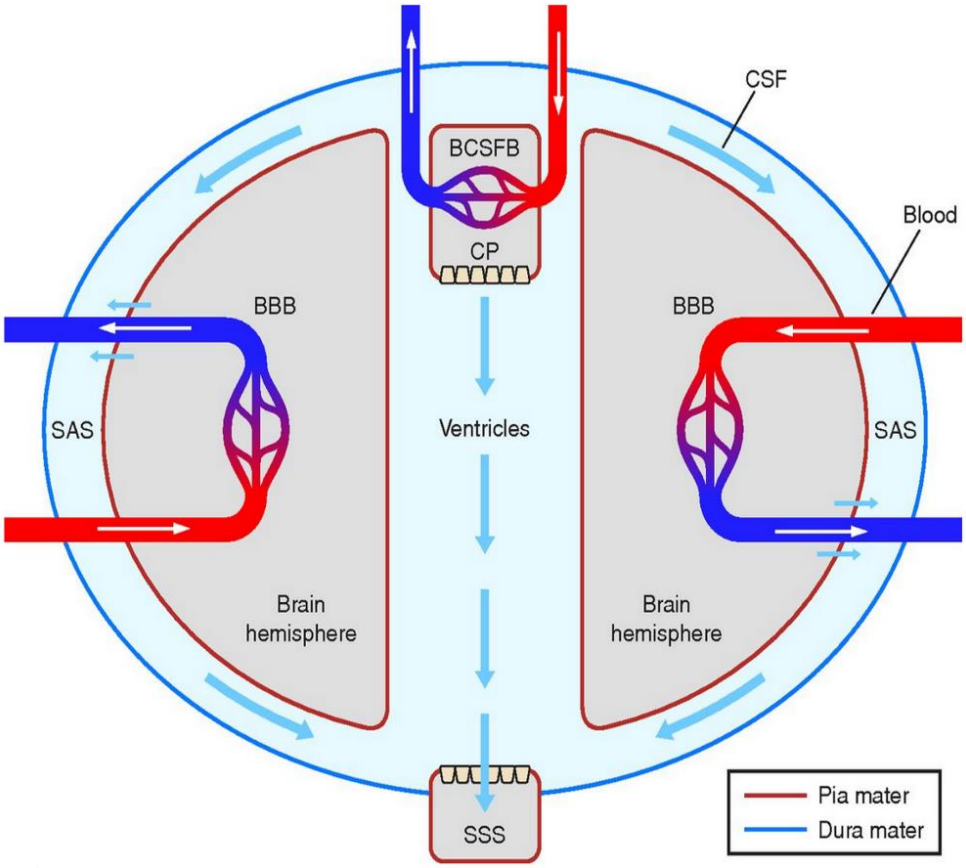


Figure 5 : Le circuit du LCR dans le cerveau (Damkier, Brown and Praetorius, 2013)**.** Produit au niveau de la barrière sang-LCR des PC, le LCR circule dans les ventricules et les espaces sous arachnoïdien, pour ensuite être éliminé au niveau des sinus veineux. SSS= sinus sagittal supérieur ; BBB= BHE ; SAS= espace sous arachnoïdien ; BSCFB= barrière sang-LCR

La BHE et le LCR sont également impliqués dans la formation d'un système d'élimination des déchets propre au SNC, appelé système glymphatique. Les structures et fonctions de ce dernier sont détaillées dans la section qui suit.

1.4. Le flux de LCR péri-vasculaire : « système glymphatique »

1.4.1. Définition

Le concept de système glymphatique (compaction des mots « glie » et « lymphatique ») décrit une voie d'élimination des déchets du parenchyme cérébral qui comme son nom l'indique dépend de la glie (et plus particulièrement des astrocytes) mais également du LCR. En circulant des espaces péri-artériolaires vers les espaces péri-veineux, le LCR entraîne avec lui les déchets cérébraux, permettant leur évacuation hors du parenchyme. Proposé pour la première fois par Maiken Nedergaard (Iliff *et al.*, 2012), la perturbation de ce système serait impliquée dans de nombreuses pathologies.

1.4.2. Structure et fonction

Lorsque les artères pie-mériennes (présentes dans l'espace sous arachnoïdien) plongent dans le parenchyme cérébral pour donner les artérioles pénétrantes, elles présentent un espace péri-vasculaire cloisonné par les pieds astrocytaires. Ces espaces périvasculaires, appelés espaces de Virchow-Robin (car décrit par Virchow en 1851 et par Robin en 1859) permettent au LCR de s'infiltrer dans le parenchyme en suivant les artères pénétrantes. Ainsi, le LCR peut suivre les vaisseaux jusqu'aux espaces perivasculaires des artérioles et des capillaires (Jessen *et al.*, 2015) (figure 6).

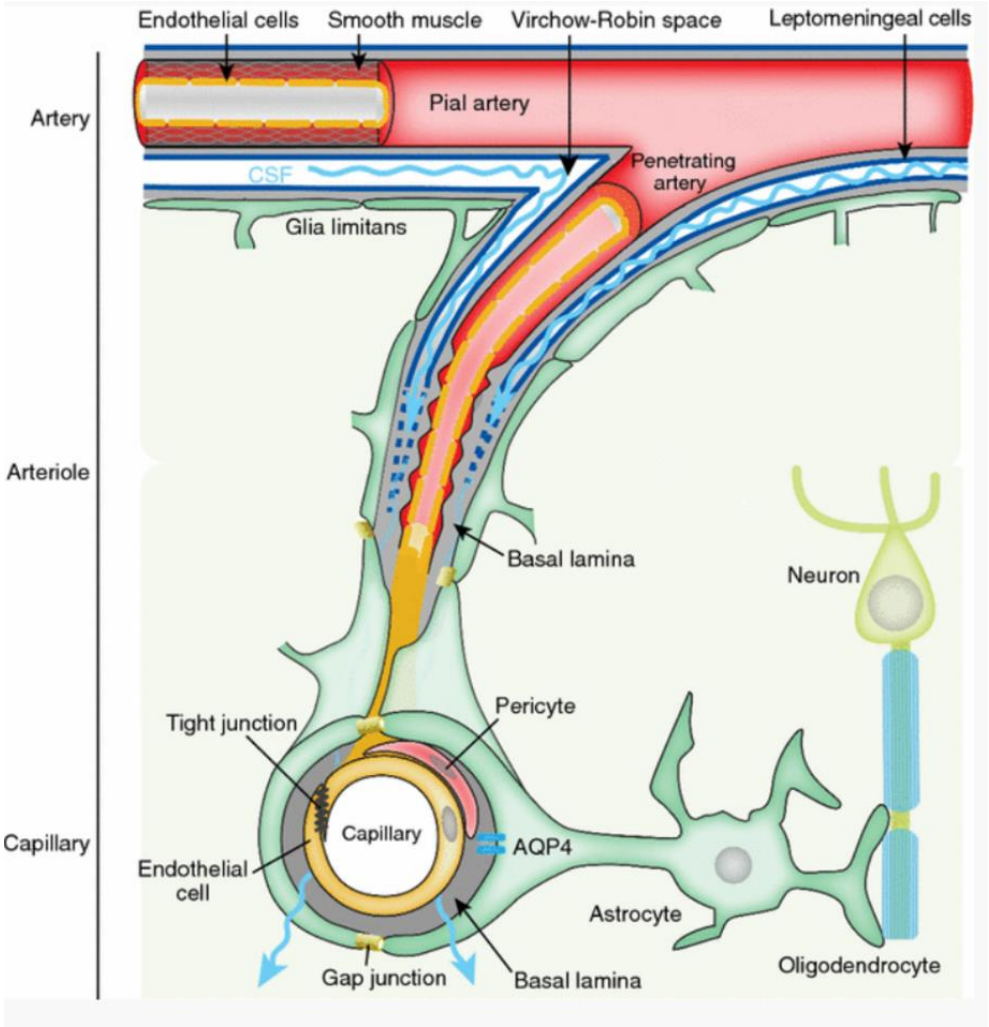


Figure 6 : Organisation des espaces périvasculaires du cerveau (Jessen et al., 2015). En plongeant dans le parenchyme cérébral, les artérioles et les pieds astrocytaires délimitent l'espace de Virchow-Robin, permettant au LCR de circuler autour des vaisseaux.

Le passage du LCR entre les pieds astrocytaires est facilité par la présence de l'AQP-4 (canaux spécifiques de l'eau): en faisant passer les molécules d'eau à travers les pieds astrocytaires, elle créé un flux de LCR entre les pieds. En circulant dans le parenchyme grâce à la combinaison de la pulsativité artérielle, de la respiration, d'une lente vasomotricité et d'un gradient de pression, le LCR va entraîner avec lui le liquide interstitiel et les solutés (<100kDa) qu'il contient vers les espaces péri-veineux. Le LCR chargé de déchets est éliminé via les vaisseaux lymphatiques présents au niveau de la dure mère et via le sang (Johnston *et al.*, 2004) (figure 7).

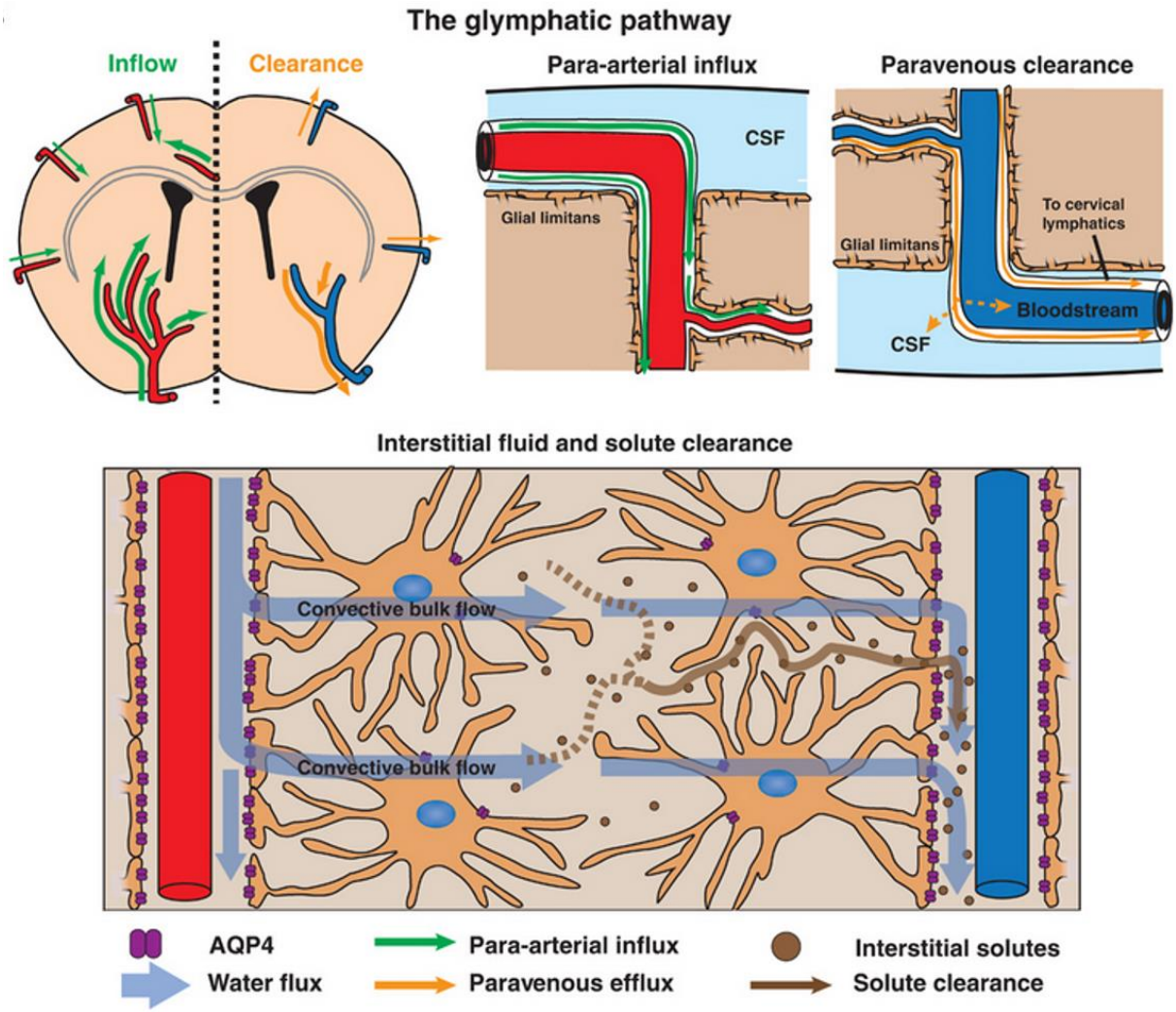


Figure 7 : Organisation du système glymphatique (Iliff et al., 2012)**.** Le flux de LCR, allant des espaces péri-veineux vers les espaces péri-artériels, il entraîne avec lui les déchets du liquide interstitiel. L'apport de LCR dans les espaces péri-artériels se fait via les artères plongeantes. Après avoir traversé le parenchyme et atteint les espaces péri-veineux, le LCR retourne en périphérie du cerveau pour être expulsé dans le sang et dans les vaisseaux lymphatiques. Ce flux de LCR est entraîné par le courant d'eau créé par l'AQP-4.

1.4.3. Les techniques utilisées pour étudier le système glymphatique

La preuve de concept du système glymphatique s'est faite avec l'injection dans la grande citerne (ou *Cisterna magna*) de traceurs fluorescents de poids moléculaires différents. Grace à l'utilisation de la microscopie bi-photonique, les auteurs ont pu montrer que le traceur de fort poids moléculaire (2000 kDa) reste confiné dans les espaces périvasculaires alors que le traceur de faible poids moléculaire (3 kDa) diffuse dans le parenchyme cérébral (Iliff *et al.*, 2012) (figure 8).

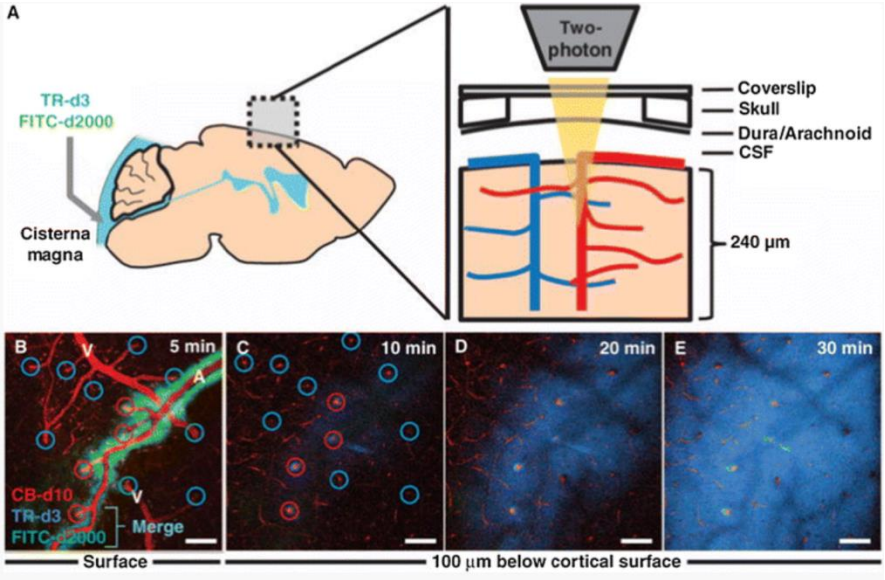


Figure 8 : Technique utilisée pour la preuve de concept du système glymphatique (Jessen et al., 2015). Après leur injection dans la grande citerne, le traceur de grand poids moléculaire reste bloqué autour des vaisseaux, alors que le traceur de petit poids moléculaire diffuse dans le parenchyme cérébral en quelques minutes.

Une seconde étude du même auteur a montré qu'il était également possible de visualiser le système glymphatique grâce à l'imagerie par résonance magnétique (IRM) pondérée en T1 après injection de gadolinium dans la grande citerne (Iliff *et al.*, 2013) (figure 9).

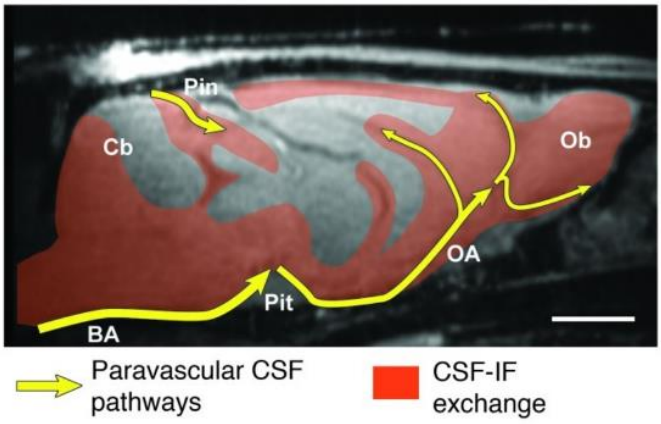


Figure 9 : IRM du système glymphatique (Iliff et al., 2013). Après son injection dans la grande citerne, il est possible de voir la diffusion du gadolinium dans le cerveau grâce à l'utilisation de séquences IRM pondérées en T1.

Cette technique a ensuite été utilisée dans notre unité de recherche pour l'étude du système glymphatique dans des modèles d'ischémies et d'hémorragies (Gaberel *et al.*, 2014).

1.4.4. Implications dans les pathologies cérébrales

Avec l'âge, le système glymphatique devient moins efficace. Il a été montré que l'activité du système glymphatique des souris âgées est réduite de 80 à 90%. Ceci aurait des implications importantes dans les pathologies touchant les personnes âgées, d'autant plus que les maladies neurodégénératives, comme la maladie d'Alzheimer, la maladie de Parkinson, la maladie de Huntington et la sclérose latérale amyotrophique sont caractérisées par une agrégation de protéines (Ross and Poirier, 2004). En accord avec cela, le peptide β-amloïde injecté par voie intra-parenchymateuse voit sa clairance diminuée de 40% chez les souris âgées par rapport aux souris jeunes. Cette baisse d'efficacité avec l'âge peut s'expliquer par une perte de la polarisation de l'AQP-4 qui n'est plus confinée aux extrémités astrocytaires mais est présente également dans les processus parenchymateux des astrocytes (Kress *et al.*, 2014). De plus, la baisse de production de LCR qui est évaluée à -66% avec l'âge (provoquant une baisse de la pression du LCR de 27%) contribue certainement au déclin du système glymphatique (Chen *et al.*, 2009; Fleischman *et al.*, 2012). En accord avec cela, une suppression du système glymphatique a été observée dans un modèle animal de maladie d'Alzheimer (Peng *et al.*, 2016). Enfin, une altération du système glymphatique a été montré dans d'autres modèles de pathologies, comme dans des modèles d'accidents vasculaires cérébraux (Gaberel *et al.*, 2014), de diabète (Jiang *et al.*, 2017) et de micro-infarctus multiples (Wang *et al.*, 2017). Cependant, la perfusion du système glymphatique n'a pas été étudiée dans certaines pathologies touchant la moelle épinière, comme c'est le cas de la sclérose en plaques.

2. La sclérose en plaques

2.1. Généralités

La sclérose en plaques (SEP) a été décrite pour la première fois par Charcot en 1868. Dans son étude, Charcot mentionnait des lésions qui, le plus souvent, étaient péri-ventriculaires et touchaient aussi bien le cerveau que la moelle épinière, causant des troubles neurologiques variés et récurrents. Une telle description au 19ème siècle, où la plupart des pathologies neurologiques étaient regroupées sous une classe appelée « troubles nerveux », reste un exploit. Nous savons aujourd'hui que la SEP est une maladie auto-immune du SNC, caractérisée par une démyélinisation parfois accompagnée de dommages axonaux. Aucune région du SNC n'étant épargnée, les symptômes sont très nombreux bien que certains soient plus fréquents, comme la fatigue, les troubles moteurs et les troubles de la vision. L'apparition et la disparition de ces symptômes est imprévisible. Aucun traitement curatif n'est aujourd'hui proposé aux patients et les causes de la maladie restent mal connues. C'est pourquoi la SEP est une pathologie particulièrement étudiée. Dans cette partie, nous ferons l'état des lieux des connaissances actuelles concernant la SEP, son épidémiologie, ses différentes formes et sa physiopathologie, en passant par son diagnostic et ses modèles animaux.

2.2. Épidémiologie

La SEP est la première cause de handicap non traumatique chez le jeune adulte. L'âge moyen d'apparition de la maladie est compris entre 30 et 40 ans, bien que des formes pédiatriques et des formes débutant après 50 ans soient parfois rencontrées. En France, on compte environ 100 000 personnes atteintes de SEP (chiffre ARSEP), et plus de 2,5 millions dans le monde (Compston and Coles, 2002).

La répartition de la maladie dans le monde n'est pas uniforme : plus on s'éloigne de l'équateur pour se rapprocher des pôles, plus les cas de SEP sont fréquents (Ascherio, Munger and Lünemann, 2012). Un gradient nord-sud est également présent à l'échelle de la France. Bien que ce gradient soit principalement attribué au niveau d'ensoleillement, l'hypothèse d'un effet de l'hygiène de vie sur le développement du système immunitaire et du microbiote n'est pas exclue. En effet, plusieurs études montrent que les personnes migrant vers un pays avant

l'adolescence héritent du risque du pays d'accueil, alors que ceux migrant après cet âge conservent le risque du pays d'origine (Dean and Elian, 1997). Des susceptibilités génétiques existent, puisque les personnes d'origine nord-européenne sont plus souvent touchées et des formes familiales de SEP ont également été décrites. Le risque de déclencher une SEP lorsqu'un parent est atteint est de 2%. Ce chiffre passe à 3% lorsqu'un frère ou sœur est atteint, et à environ 35% lorsqu'un frère jumeau monozygote est touché (Compston and Coles, 2002). Ainsi, la SEP est aujourd'hui considérée comme une maladie déclenchée par un ou plusieurs facteurs environnementaux, sur des personnes disposant d'un terrain génétique favorable.

Parmi les 4000 à 6000 nouveaux cas diagnostiqués chaque année en France, les ¾ sont des femmes (chiffres de la fondation pour l'aide à la recherche sur la sclérose en plaque, ARSEP). Ainsi, il semblerait que les hormones masculines soient protectrices par rapport aux hormones féminines (Gold and Voskuhl, 2009). Un essai clinique visant à évaluer l'efficacité de la testostérone dans le traitement de la SEP est actuellement en cours (ClinicalTrials.gov NCT00405353). Dans ce sens, les cas de SEP débutant avant la puberté touchent autant les filles que les garçons et pendant la grossesse, le risque d'être confronté à une poussée de SEP est plus faible. Paradoxalement, bien que les femmes aient plus de risque d'être touchées par la SEP, leur pronostic semble meilleur que celui des hommes concernant l'évolution de la maladie vers le handicap (Voskuhl and Gold, 2012). En conclusion, les études épidémiologiques pointent un effet des hormones dans la déclaration et l'évolution de la SEP, mais les mécanismes impliqués sont encore mal connus.

2.3. Les différentes formes de SEP

L'évolution de la SEP est hétérogène selon les patients. Certains sont touchés par des poussées et des rémissions successives et imprévisibles, alors que d'autres voient leur déficit croître constamment avec le temps. Aujourd'hui, les SEP sont classées en 3 catégories, que l'on appelle récurrente-rémittente, progressive primaire, et secondairement progressive.

La forme récurrente-rémittente se caractérise par une succession de survenues ou d'aggravations de symptômes (appelées poussées) espacées de récupérations plus ou moins complètes (figure 10). Une poussée est définie par une apparition de symptômes typiques

d'un évènement démyélinisant, et ayant une durée d'au moins 24h. La fréquence, la durée et la sévérité des poussées et des récupérations sont imprévisibles. Environ 85 % des patients débutent leur SEP avec une forme récurrente-rémittente, ce qui en fait la forme la plus courante.

La forme progressive primaire (aussi appelée forme progressive d'emblée) se caractérise par une aggravation constante de la maladie, sans récupération (figure 10). Elle est plus rare puisque seulement 15% des patients débutent leur SEP avec une forme progressive. Dans cette forme, les patients peuvent aussi être confrontés à des périodes de stabilité clinique, pendant lesquelles les symptômes ne s'aggravent pas. Contrairement à la forme récurrente-rémittente, la forme progressive primaire touche autant les hommes que les femmes.

La forme secondairement progressive se caractérise par une forme progressive succédant à une forme récurrente-rémittente. Ainsi, les patients débutent la maladie par une succession de poussées et de rémissions, puis évoluent progressivement vers une aggravation clinique constante (figure 10). On estime qu'environ 80% des SEP récurrentes-rémittentes évoluent vers une forme secondairement progressive une à deux décennies après la pose du diagnostic (Dendrou, Fugger and Friese, 2015).

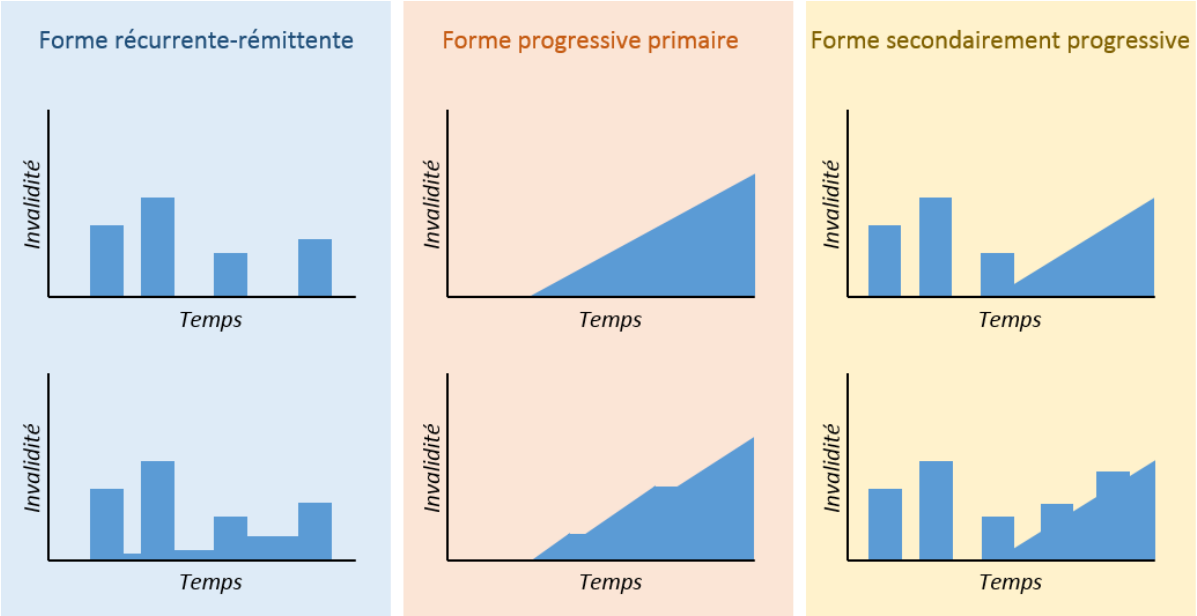


Figure 10 : Hétérogénéité clinique de la SEP. Gauche : formes récurrentes-rémittentes sans (courbe du haut) ou avec (courbe du bas) accumulation de déficits. Milieu : formes progressive primaire avec une évolution linéaire (courbe du haut) ou avec des périodes de stabilité (courbe du bas). Droite : Formes secondairement progressives sans (courbe du haut) ou avec (courbe du bas) poussées résiduelles.

Cependant, toutes les SEP ne sont pas invalidantes. Certains patients, touchés par des formes dites « bénignes » n'accumulent pas un handicap suffisant pour être gênés dans leur vie quotidienne. Les formes bénignes de SEP sont caractérisées par des SEP dont le score EDSS (pour « Expanded Disability Status Scale ») n'excède pas 3.0 dix ans après la première manifestation clinique (correspondant à un handicap modéré d'un paramètre fonctionnel sans problème de déambulation). La proportion des formes bénignes est comprise entre 5 et 40% selon les études. Cependant, le terme de SEP bénigne est à prendre avec précaution, étant donné que sa définition s'appuie essentiellement sur des déficits moteurs. Ainsi, il a été montré que des troubles cognitifs sont présents chez 45% des patients atteints de SEP dite bénigne et qu'une fatigue anormale était présente chez 49% d'entre eux (Amato *et al.*, 2006).

2.4. Physiopathologie de la SEP

2.4.1. Généralités

La SEP est une maladie auto-immune démyélinisante du SNC, accompagnée dans la majorité des cas par une infiltration anormale de cellules immunitaires et d'une rupture de l'intégrité de la BHE. Bien que plus de 100 gènes de susceptibilité aient été identifiés comme jouant un rôle dans la maladie (International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC) *et al.*, 2013), l'origine de la SEP reste inconnue. En accord avec l'aspect auto-immun de la maladie, la majorité de ces gènes de susceptibilité sont des gènes de l'immunité. Une des principales caractéristique de la SEP est la présence de zones de démyélinisation (appelées « plaques » ou « lésions ») dans le cerveau et/ou la moelle épinière des patients. Ces lésions sont caractérisées par une destruction des gaines de myéline et une mort des oligodendrocytes. Bien que les axones et les neurones soient épargnés au début de la maladie, ces derniers sont de plus en plus touchés dans les phases tardives, provoquant des déficits irréversibles. Cette atteinte tardive des neurones est souvent associée à une évolution vers une forme progressive participant à une atrophie cérébrale accompagnée d'un élargissement ventriculaire (Dendrou, Fugger and Friese, 2015) (figure 11).

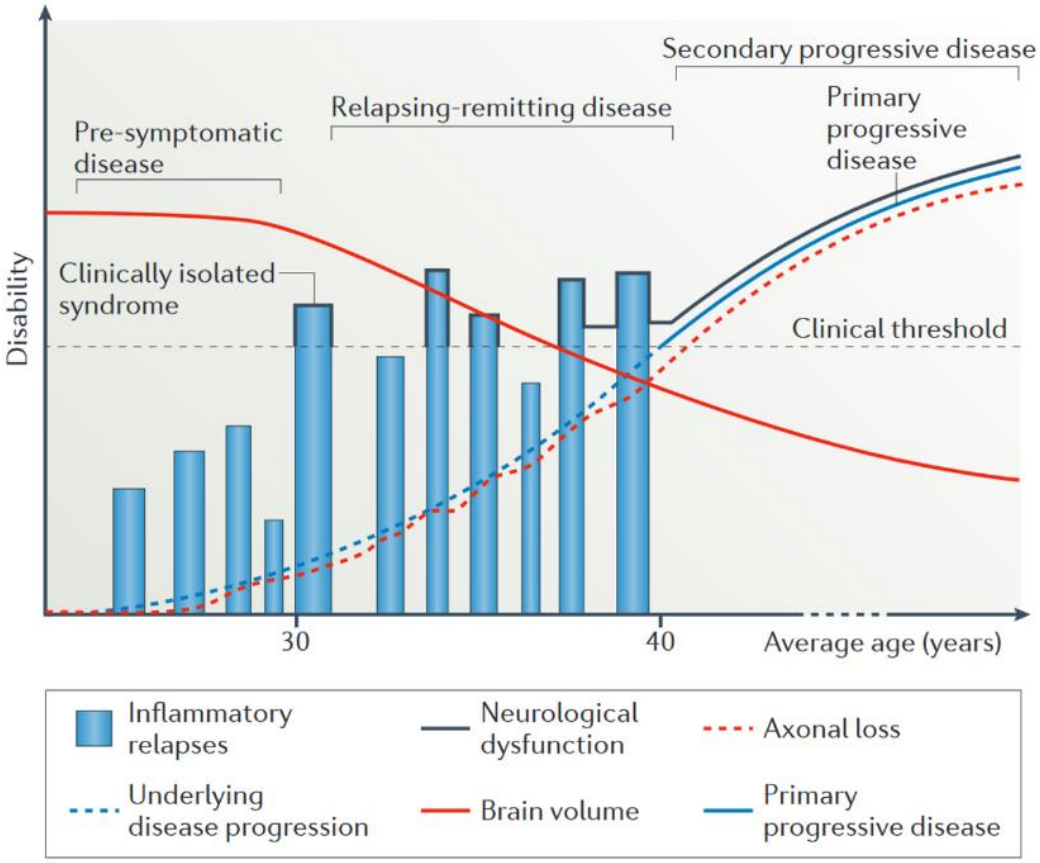


Figure 11 : Caractéristiques et dysfonctions retrouvées dans la SEP (Dendrou, Fugger and Friese, 2015)**.** Les SEP récurrentes-rémittentes sont caractérisées par des poussées inflammatoires démyélinisantes alors que les SEP progressives semblent être principalement neurodégénératives. Plus la maladie progresse, plus vont s'accumuler les dommages irréversibles associés à une perte axonale et une atrophie cérébrale. Ce schéma montre que pour être symptomatiques, les dommages doivent être suffisamment importants (notion de seuil clinique). Ainsi, il semblerait qu'il puisse exister une phase pré-symptomatique contenant un certain nombre de poussées « silencieuses » (car ne provoquant pas de dysfonction neurologique).

Le passage vers une forme progressive est souvent associé au passage d'une pathologie inflammatoire avec poussées vers une pathologie essentiellement neurodégénératif. Cependant, les analyses immunopathologiques montrent qu'une composante inflammatoire est toujours présente au stade progressif de la maladie, mais de manière plus diffuse et provoquant des atteintes disséminées de la myéline et des axones (Kutzelnigg *et al.*, 2005).

2.4.2. Les cellules immunitaires impliquées dans la SEP

Des éléments montrent que la SEP est majoritairement une maladie inflammatoire auto-immune du SNC, comme la nature des gènes de prédisposition, la présence d'infiltrats de cellules immunitaires, ou encore la réponse des patients aux traitements immunosuppresseurs. Ainsi, il a été mis en évidence que de nombreuses cellules immunitaires sont impliquées dans la SEP. Parmi ces cellules, on retrouve principalement les lymphocytes T et B, les macrophages, la microglie, les neutrophiles et les cellules dendritiques. Dans cette section, seront traités les rôles souvent délétères, mais parfois bénéfiques, joués par ces cellules dans la SEP.

2.4.2.1. Les Lymphocytes T

Les lymphocytes T (LT) appartiennent au système immunitaire adaptatif, répondant de manière durable à un antigène spécifique (à l'opposé du système immunitaire inné qui répond de manière immédiate et non spécifique à un agent infectieux). Parmi ces lymphocytes, on trouve les LT CD4+ (appelé LT « auxiliaires » ou « helper ») et les LT CD8+ (ou cytotoxiques). Les LT CD4+ répondent au complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe II qui est exprimé par les CPA et associé à la présentation d'antigènes provenant du milieu extracellulaire. Les LT CD4+ agissent comme des intermédiaires de l'immunité, c'est-à-dire qu'ils ne vont pas agir directement sur la cible concernée mais qu'ils vont activer d'autres cellules immunitaires qui agiront contre la cible porteuse de l'antigène. À l'inverse, les LT CD8+ ont la capacité de libérer des molécules toxiques qui agissent directement contre leurs cibles. Les LT CD8+ sont activés par le CMH de classe I qui est exprimé par toutes les cellules nucléées du corps humain (sauf les cellules germinales) et est associé à la présentation d'antigènes provenant du milieu intracellulaire. Les LT qui sont détectables dès les phases précoces de la SEP (Popescu and Lucchinetti, 2012), sont activés contre des peptides de myéline comme la protéine basique de la myéline (PBM) ou la protéine proteolipidique (PLP) (Hellings *et al.*, 2001).

Les LT CD4+ impliqués dans la SEP peuvent être séparés en 3 catégories, les T_H1 et les T_H17 considérés comme délétères et les T_{REG} qui sont considérés comme bénéfiques. Les T_H1 dont la signature est la production de la cytokine IFN-γ ont longtemps été considérés comme étant les principaux lymphocytes pathogéniques modulant l'inflammation dans la SEP et ses

modèles. En effet, le transfert adoptif des T_H1 suffit à induire la maladie (Pierson *et al.*, 2012), et la déficience en T-bet, un facteur de transcription essentiel à l'expression de IFN-γ, confère une résistance à la maladie (Bettelli *et al.*, 2004). Cependant, une étude plus récente montre que les souris déficientes en T-bet n'ont certes pas une inflammation médiée par les T_H1 mais peuvent tout de même tomber malade via une inflammation médiée seulement par les T_H17 (O'Connor *et al.*, 2013). Aujourd'hui, il est admis que les deux types de LT CD4+ sont impliqués dans la physiopathologie de la SEP, puisque l'expression de leur signature respective (IFN-γ pour les T_H1 et IL-17 pour les T_H17) par les lymphocytes circulant augmente chez les patients atteints de SEP. De façon intéressante, il a été montré que les T_H1 s'infiltrent préférentiellement dans la moelle épinière de manière dépendante à l'α4 alors que les T_H17 le font principalement dans le cerveau, de manière indépendante à l' α4 (Rothhammer *et al.*, 2011). Cependant leur rôle respectif dans les phases précoces et tardives de la maladie est encore débattu (Frisullo *et al.*, 2008; Dendrou, Fugger and Friese, 2015), d'autant plus qu'un phénotype intermédiaire exprimant à la fois IFN-γ et IL-17 a été identifié dans la SEP et ses modèles animaux (Kebir *et al.*, 2009). Les T_{REG} sont des LT CD4+ anti-inflammatoires exprimant CD25 et FoxP3 et produisant de l'IL-10 et du TGF-β. Leur rôle physiologique est de tempérer les réactions inflammatoires afin d'éviter qu'elles ne menacent l'intégrité de l'organisme en devenant trop importantes ou en perdurant indéfiniment. Pour cela, les T_{REG} ont la capacité d'inhiber la prolifération et la production de cytokines des autres leucocytes. Ainsi, un équilibre précis entre les éléments pro- et anti-inflammatoires est nécessaire afin d'avoir un système immunitaire prêt à défendre l'organisme contre les agents pathogènes, sans présenter de risques pour l'organisme en réagissant contre les auto-antigènes (Lowther and Hafler, 2012). Chez les patients atteints de SEP, cet équilibre est rompu par une perturbation du bon fonctionnement des T_{REG} (Feger *et al.*, 2007; Venken *et al.*, 2008). Ce dysfonctionnement, qui semble participer à la progression de la SEP, ne semble pas en être à l'origine, puisque les personnes atteintes du syndrome IPEX (causé par une mutation de FoxP3) ne présentent pas de réactions auto-immunes contre le CNS (Ochs *et al.*, 2001; Dendrou, Fugger and Friese, 2015). En accord avec leur rôle protecteur, il a été montré que le transfert adoptif de T_{REG} est bénéfique dans un modèle animal de SEP (Kohm *et al.*, 2002) et que ces derniers s'accumulent dans le CNS lors des phases de récupération chez l'Homme et l'Animal (Korn *et al.*, 2007; Lowther and Hafler, 2012).

Les LT CD8+ sont plus nombreux que les LT CD4+ dans les lésions de SEP, et leur nombre est corrélé au dommage axonal (Frischer *et al.*, 2009). En libérant de la perforine et des granzimes, les LT CD8+ ont une action cytotoxique sur les cellules cibles : la perforine perméabilise les membranes, permettant aux granzimes de pénétrer dans les cellules pour y dégrader les protéines et ainsi induire l'apoptose de la cible. Pour reconnaître et éliminer une cellule cible, les LT CD8+ interagissent avec le CMH I de cette dernière. Bien que le CMH de classe I soit normalement associé à la présentation d'antigènes synthétisés par la cellule elle-même, il a été montré qu'un antigène extérieur internalisé par une cellule peut ensuite être présenté via le CMH I. Ainsi, les cellules endothéliales de la BHE ont la capacité de présenter à leur surface des antigènes du parenchyme cérébral pour que ces derniers soient reconnus par les LT CD8+ (Galea *et al.*, 2007). Il été montré de façon intéressante que l'expression du CMH I par les oligodendrocytes et les neurones augmente dans la SEP, et ce en fonction de la sévérité de la maladie ou de l'activité des lésions (Höftberger *et al.*, 2004). En accord avec cela, des contacts étroits entre les axones démyélinisés et les LT CD8+ ont été observés dans les lésions de SEP (Neumann *et al.*, 2002), et les LT CD8+ activés contre la protéine basique de la myéline (PMB) sont capables de lyser les oligodendorcytes *in vitro* (Jurewicz, Biddison and Antel, 1998). Bien que principalement connus pour leurs effets cytotoxiques, il est aujourd'hui suggéré que certains LT CD8+ jouent également un rôle régulateur dans la SEP et ses modèles animaux en inhibant l'expansion des LT CD4+ (Hu *et al.*, 2004).

Ainsi, les rôles des différents lymphocytes sont extrêmement variés et complexes. Les sous-populations de lymphocytes CD4+ et CD8+ peuvent avoir des rôles opposés en contribuant dans certains cas à l'aggravation de la maladie, ou, dans d'autres, en diminuant l'inflammation. De plus, la plasticité des lymphocytes participe à cette complexité. En effet, il a été montré que les lymphocytes peuvent se différencier, et ainsi passer d'un phénotype à un autre. Les T_H17 peuvent ainsi se différencier en T_H1 (Hirota *et al.*, 2011) et les T_{REG} ont la capacité de réduire leur pouvoir immunosuppresseur en sécrétant de l'IFN-γ (correspondant normalement au phénotype T_H1) (Dominguez-Villar, Baecher-Allan and Hafler, 2011). Inversement, les T_{REG} sont capables de se différencier en T_H17 pro-inflammatoires (Komatsu *et al.*, 2013).

2.4.2.2. Les lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) sont les cellules immunitaires responsables de la production d'anticorps (aussi appelés immunoglobulines). Après avoir été activés contre un antigène, les LB vont se différencier en LB mémoires (permettant une réaction plus rapide en cas d'une seconde exposition à l'antigène) ou en plasmocytes capables de produire des anticorps. En se fixant sur leur antigène, les anticorps vont permettre aux cellules phagocytaires de reconnaître la cible plus aisément. Une des principales preuves d'un rôle joué par les LB dans la SEP est l'augmentation de la quantité d'immunoglobulines dans le LCR chez plus de 95% des patients (Freedman *et al.*, 2005). De façon intéressante, il a été montré que les immunoglobulines rencontrées dans le LCR des patients ont une affinité faible pour la substance blanche intacte, mais une forte affinité pour la myéline lésée présente au niveau des plaques de démyélinisation (von Büdingen *et al.*, 2008). Cependant, ces résultats sont encore controversés, d'autant plus qu'il a été montré que la majorité de ces immunoglobulines ne sont pas ciblées contre les candidats soupçonnés d'être les principaux auto-antigènes rencontrés dans la SEP (Owens *et al.*, 2009). D'autres éléments vont en faveur d'un rôle délétère joué par les LB dans la SEP, comme le fait que le rituximab, un anticorps monoclonal anti-CD20 permettant la déplétion en LB a montré des effets bénéfiques aussi bien dans les formes récurrentes-rémittentes (Hauser *et al.*, 2008) que dans les phases précoces des formes progressives primaires (Hawker *et al.*, 2009). Cependant, cet effet bénéfique dans la SEP ne passe pas par une réduction de la quantité d'anticorps dans le LCR des patients. D'autres explications pourraient cependant expliquer les effets bénéfiques de cette déplétion, puisque les LB peuvent également endosser le rôle de CPA. En internalisant les antigènes solubles, les lymphocytes B ont la capacité de présenter des antigènes aux LT via leur CMH de classe II, et ce aussi efficacement que les cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes (Ashwell *et al.*, 1984; Lankar *et al.*, 1998).

2.4.2.3. Les macrophages et la microglie

Les macrophages sont des cellules immunitaires dont les principales fonctions sont la phagocytose, et la présentation d'antigène. Les macrophages circulants sont appelés monocytes. Au moment de s'infiltrer, les monocytes subissent la dernière étape de leur différenciation pour devenir des macrophages. Il existe également des macrophages dits

« péri-vasculaires » résidents au niveau des vaisseaux du parenchyme cérébral, des méninges et des PC (Goldmann *et al.*, 2016). De plus, il existe une importante quantité de macrophages résidents au sein du parenchyme cérébral, appelés microglie.

Les macrophages sont présents en grande quantité dans les lésions de SEP (Trebst *et al.*, 2001) et contribuent à leur développement en libérant des médiateurs toxiques et en élevant le niveau d'expression des molécules de costimulation (Bogie, Stinissen and Hendriks, 2014). Robin J.M. Franklin et collaborateurs ont montré que les macrophages peuvent également jouer des rôles bénéfiques dans la SEP. Ils ont ainsi montré que les progéniteurs d'oligodendrocytes expriment des molécules inflammatoires permettant le recrutement des macrophages au sein de la lésion. La présence de ces macrophages dans la lésion permet d'accélérer significativement la remyélinisation. Cet effet bénéfique s'expliquerait en grande partie par la capacité des macrophages à phagocyter les débris de myéline, libérant ainsi le « chemin » aux progéniteurs d'oligodendrocytes (OPCs). Les capacités de remyélinisation diminuent avec le temps chez les patients atteints de SEP. En accord avec cela, il a été montré que les macrophages issus de souris jeune phagocytent les débris de myéline plus rapidement que les macrophages de souris âgées. Cette baisse d'efficacité pourrait s'expliquer par la baisse d'expression des gènes RXR (retinoid-X receptor) par les macrophages au cours du vieillissement. En présence d'un agoniste RXR, les macrophages issus de souris âgées voient leurs capacités de phagocytose des débris de myéline améliorées. Ces observations ont abouti à un essai clinique du bexarotene (agoniste RXR) chez les patients atteints de SEP récurrente-rémittente afin d'évaluer sa capacité à promouvoir la remyélinisation (Kotter *et al.*, 2001; Setzu *et al.*, 2006; Ruckh *et al.*, 2012; Natrajan *et al.*, 2015).

La microglie joue un rôle primordial dans le maintien de l'homéostasie cérébrale (Prinz *et al.*, 2014). Il a été montré que l'activation microgliale se produit très tôt dans la SEP (Ponomarev *et al.*, 2005) et que son inhibition aux stades précoces diminue la sévérité de la maladie (Bhasin, Wu and Tsirka, 2007). En accord avec cela, la microglie activée dans les lésions contient des débris de myéline et d'axone, exprime le CMH de classe II et libère une importante quantité de molécules pro-inflammatoires et neurotoxiques (Bogie, Stinissen and Hendriks, 2014). La microglie pourrait ainsi participer à l'auto-immunité contre la myéline et les axones (Huizinga *et al.*, 2012). Différents stades d'activation de la microglie et des macrophages ont pu être identifiés *in vitro*. En fonction des stimulations, il semblerait que la

microglie puisse se polariser vers un profil pro-inflammatoire appelé M1 ou vers un profil anti-inflammatoire appelé M2. Ainsi, la microglie M1 interviendrait aux stades précoces de l'inflammation en libérant des cytokines pro-inflammatoires et en présentant les antigènes aux lymphocytes, alors que la microglie M2 interviendrait dans un second temps pour rétablir l'homéostasie en libérant des molécules anti-inflammatoires comme l'IL-10 ou le TGF-β (Murray and Wynn, 2011; Bogie, Stinissen and Hendriks, 2014; Orihuela, McPherson and Harry, 2016). Cependant, la notion de profil M1 et M2 est de plus en plus contestée, puisqu'il semblerait que de nombreux profils intermédiaires soient possibles.

2.4.2.4. Les neutrophiles

Les neutrophiles représentent plus de 60% des leucocytes présents dans le sang et sont généralement les premières cellules à être recrutées sur un site d'inflammation (Kolaczkowska and Kubes, 2013). Impliqués dans l'immunité innée, les neutrophiles peuvent phagocyter leur cible et possèdent un nombre important de vésicules remplies de molécules pro-inflammatoires, et sont ainsi capables de libérer très rapidement une importante quantité de cytokines au niveau des sites d'inflammation (Borregaard *et al.*, 1990; Kolaczkowska and Kubes, 2013). La durée de vie des neutrophiles est extrêmes courte. Ainsi, des neutrophiles cultivés *in vitro*, et injectés *in vivo* ont une demi-vie plasmatique de 1,5h chez la souris et 8h chez l'Humain. Cependant, une étude montre qu'en condition naturelle, les neutrophiles circulants peuvent vivre jusqu'à 12h chez la souris et 5 jours chez l'Humain (Pillay *et al.*, 2010). Ces résultats sont encore controversés (Tofts *et al.*, 2011), d'autant qu'en cas d'activation leur longévité semble augmenter. En accord avec une implication des neutrophiles dans la physiopathologie de la SEP, il a été montré une augmentation du nombre de ces derniers dans la moelle osseuse et dans le sang dans les phases précoces de la maladie, et que la quantité de molécules exprimées par les neutrophiles est corrélée au nombre de lésions et à l'invalidité clinique. De plus, la déplétion en neutrophiles est bénéfique dans les modèles animaux de SEP (Rumble *et al.*, 2015). Il est à noter que les neutrophiles sont moins nombreux dans la SEP que dans d'autres maladies auto-immunes comme la neuromyélite optique, mais qu'ils possèdent une capacité d'adhésion vasculaire et de migration accrue, ainsi qu'une synthèse augmentée de dérivés réactifs de l'oxygène (Hertwig *et al.*, 2016).

2.4.2.5. Les cellules dendritiques

Les cellules dendritiques sont des cellules spécialisées dans la présentation d'antigènes et jouent le rôle de messagers entre l'immunité innée et l'immunité adaptative. Ces cellules sondent constamment l'organisme à la recherche d'agents pathogènes. Elles sont capables de phagocyter les pathogènes pour ensuite présenter des fragments de ces derniers à leur surface *via* le CMH II. Ces cellules sont capables de retourner dans les nœuds lymphatiques pour y activer les lymphocytes naïfs, et participent ainsi au déploiement de l'immunité adaptative. La présence de cellules dendritiques au niveau des espaces péri-vasculaires, des méninges et des PC les place au rang d'acteurs majeurs de la surveillance immunitaire du SNC. Sans surprise, les cellules dendritiques jouent un rôle important dans la SEP. Elles sont retrouvées en grand nombre dans les lésions et dans le LCR des patients, et ce principalement dans les phases actives de la maladie (phases précoces et pendant les rechutes) (Longhini *et al.*, 2011; Nuyts *et al.*, 2013). En accord avec cela, il a été montré dans un modèle animal de SEP que les cellules dendritiques sont capables de présenter de manière efficace un peptide de myéline aux lymphocytes T périphériques et ainsi de provoquer une réaction auto-immune (Dittel *et al.*, 1999). De plus, il a été montré que pour être autorisés à s'infiltrer dans le SNC, les lymphocytes doivent êtres réactivés par des cellules dendritiques présentes sur place (Greter *et al.*, 2005). Il semblerait que les cellules dendritiques puissent également jouer un rôle anti-inflammatoire dans la SEP en ayant la capacité d'inhiber la prolifération des lymphocytes T (Suter *et al.*, 2003). Ainsi, de nombreuses stratégies thérapeutiques visant à cibler les actions pro-inflammatoires des cellules dendritiques sont actuellement examinées pour l'élaboration de nouveaux traitements contre la SEP (Comabella *et al.*, 2010).

	Délétère	Bénéfique
Lymphocyte T CD4+	T_H1 et T_H17: sécrétion de cytokines pro-inflammatoires	T_{REG} : inhibition de la prolifération des autres lymphocytes
Lymphocyte T CD8+	Libération de molécules cytotoxiques capables d'endommager les gaines de myéline et les axones	Sous population de LT CD8+ capable d'inhiber l'expansion des LT CD4+
Lymphocyte B	Production d'anticorps Capacité de présenter des antigènes aux LT	
Macrophages/Microglie	Profil M1: libération de médiateurs toxiques Phagocytose de la myéline Capacité de présenter des antigènes aux LT	Améliore la remyélinisation en éliminant les débits de myéline Profil M2: libération de molécules anti-inflammatoires
Neutrophiles	Libération en grande quantité de molécules pro-inflammatoires	
Cellules dendritiques	Présentation d'antigènes de myéline aux LT	Sous population capable d'inhiber la prolifération des LT

Table 2 : Effets délétères ou bénéfiques des différentes cellules immunitaires impliquées dans la pathophysiologie de la SEP.

Pour exercer leurs effets sur le SNC, les cellules immunitaires sont capables de s'infiltrer à travers les vaisseaux du cerveau pour atteindre le parenchyme. Pour cela, elles interagissent avec les cellules endothéliales en suivant plusieurs étapes qui seront détaillées si dessous.

2.4.3. Interaction des cellules immunitaires avec la BHE

Dans la SEP, le privilège immunitaire du SNC est rompu. L'altération des barrières vasculaires et l'expression de molécules à la surface des cellules endothéliales permettent l'infiltration de cellules immunitaires dans le parenchyme du SNC. Cette infiltration se fait en plusieurs étapes étroitement contrôlées : (1) la capture et le roulement du leucocyte sur la paroi vasculaire ; (2) l'activation leucocytaire ; (3) l'arrêt et la patrouille du leucocyte ; (4) la diapédèse du leucocyte (Takeshita and Ransohoff, 2012). Chacune de ces étapes est caractérisée et contrôlée par l'expression de chimiokines et de molécules d'adhésion spécifiques (figure 12).

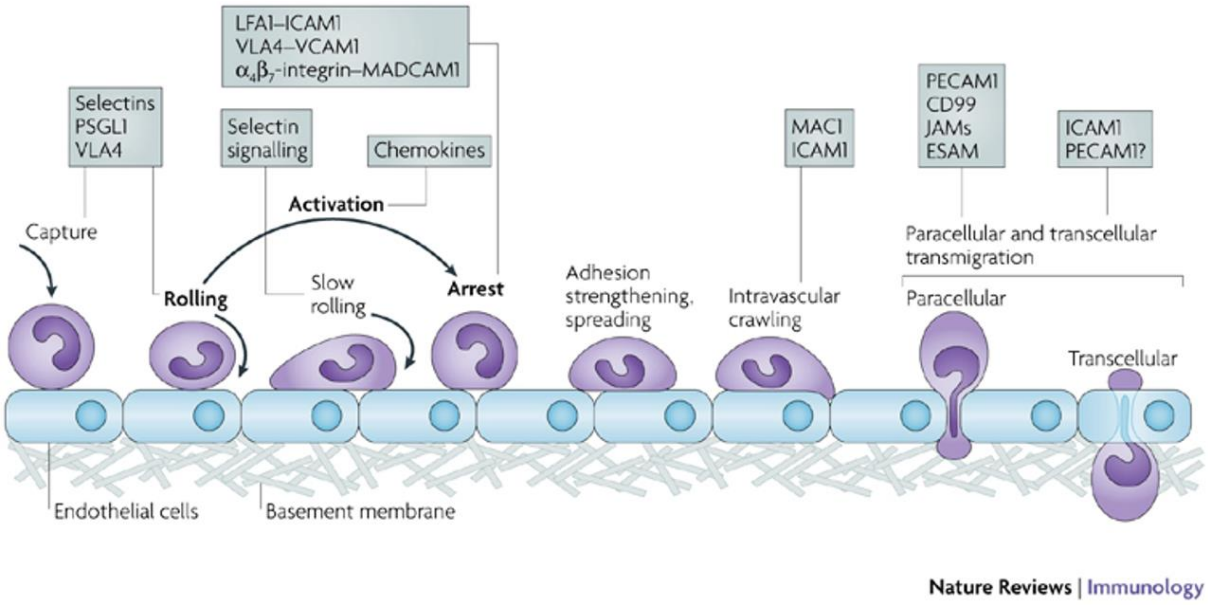


Figure 12 : L'infiltration leucocytaire à travers la BHE. Cette infiltration peut être séparée en différentes étapes : (1) la capture et le roulement (« rolling ») du leucocyte, (2) l'activation par les chimiokines, (3) l'adhésion (arrest) et la patrouille (crawling) du leucocyte et (4) la diapédèse paracellulaire ou trancellulaire (adapté de Ley et al., 2007).

Le roulement (ou « rolling ») est la première étape de contact entre les leucocytes circulants et les cellules endothéliales. Cette étape fait intervenir l'interaction des sélectines P et E (respectivement CD62P et CD62E) exprimées par les cellules endothéliales avec leur ligand leucocytaire appelé PSGL1 (pour P-selectin glycoprotein ligand-1 ou CD162) (Sathiyanadan *et al.*, 2014). Cette interaction de faible affinité permet aux leucocytes de rouler sur la paroi vasculaire afin de ralentir progressivement en luttant contre le flux sanguin. De façon surprenante, il a été montré que le roulement des leucocytes ne semble pas nécessaire à leur infiltration. En effet, le blocage ou l'absence d'expression de la P-sélectine bloque le roulement mais n'empêche pas l'infiltration des leucocytes et ne modifie pas l'apparition et l'évolution de la maladie dans les modèles animaux de SEP (Kerfoot *et al.*, 2006; Takeshita and Ransohoff, 2012; Sathiyanadan *et al.*, 2014). De manière intéressante, il a été montré que le roulement des leucocytes se produit dès 48h avant les premiers symptômes, et que l'expression de la P-sélectine dans le cerveau et la moelle épinière augmente avant l'apparition des premiers déficits pour ensuite diminuer dans les phases tardives de la maladie (Kerfoot and Kubes, 2002).

L'activation des leucocytes, qui fait suite à leur roulement sur l'endothélium vasculaire, est rendu possible grâce à l'expression de chimiokines par les cellules endothéliales. Par exemple, les cellules endothéliales de la BHE expriment CXCL12 qui active les leucocytes *via* le récepteur CXCR4 (CD184) (Takeshita and Ransohoff, 2012). En accord avec cela, il a été montré dans la SEP que l'expression pathologique de CXCL12 par la BHE était corrélée à la sévérité de la maladie (McCandless *et al.*, 2008). Cette activation induit un changement de conformation des intégrines exprimées par les leucocytes, leur permettant d'interagir avec une meilleure affinité à l'endothélium vasculaire (Laudanna *et al.*, 2002).

L'adhésion (ou arrêt) des leukocytes sur la paroi vasculaire est possible grâce à l'interaction d'intégrines leucocytaires avec les molécules d'adhésions exprimées par les cellules endothéliales. Parmi ces intégrines, on retrouve principalement VLA-4 (pour « Very Late Antigen-4, composée du CD49d et du CD29) et LFA-1 (pour « Lymphocyte Function-associated Antigen 1 », composée du CD18 et du CD11a) qui reconnaissent respectivement VCAM-1 (pour « Vascular Cell Adhesion Molecule 1 », CD106) et ICAM-1 (pour « InterCellular Adhesion Molecule-1, CD54). En plus de permettre l'arrêt des leucocytes, l'interaction VLA-4/VCAM-1 et LFA-1/ICAM-1 génère des cascades de signalisation au niveau des leucocytes et des cellules endothéliales, qui sont nécessaires à l'infiltration. Contrairement au roulement, l'adhésion semble cruciale pour l'infiltration, comme le montre cette étude selon laquelle un anticorps dirigé contre VLA-4 prévient l'apparition de la maladie dans un modèle de SEP (Yednock *et al.*, 1992). Cette découverte donnera lieu à l'élaboration d'un traitement contre les formes récurrentes-rémittentes de la SEP : le Natalizumab® (Polman *et al.*, 2006). Une fois arrêtés, les leucocytes vont pouvoir patrouiller sur l'endothélium (le plus souvent dans une direction contraire au flux sanguin) grâce à l'intégrine Mac-1 (pour « Macrophage integrin-1 », composée du CD18 et du CD11b) afin de scanner la lumière des vaisseaux et ainsi se placer sur le site optimal pour l'infiltration (Schenkel, Mamdouh and Muller, 2004; Phillipson *et al.*, 2006; Steiner *et al.*, 2010). De plus, il a été montré que les cellules endothéliales sont ainsi capables de diriger les leucocytes patrouillant vers le site d'inflammation grâce à un gradient de chimiokines (Massena *et al.*, 2010).

La diapédèse des leucocytes peut se faire de manière soit transcellulaire, soit paracellulaire. Pour pénétrer dans le parenchyme du SNC, les leucocytes doivent franchir les cellules endothéliales, mais également la ou les lame(s) basale(s). Il est estimé que traverser

les cellules endothéliales prend environ 2 à 5 minutes aux leucocytes, tandis que traverser la lame basale est plus long, et dure 5 à 15 minutes (Ley *et al.*, 2007). La diapédèse paracellulaire des leucocytes semble être dépendante des concentrations intracellulaires de Ca^{2+} des cellules endothéliales. Une augmentation de la concentration de Ca^{2+} dans les cellules endothéliales entraînerait l'ouverture des contacts entre ces cellules en provoquant leur contraction (Huang *et al.*, 1993; Ley *et al.*, 2007). Un gradient d'expression membranaire de PECAM-1 (pour « Platelet/Endothelial-Cell Adhesion Molecule-1 », CD31), qui est fortement exprimée au niveau des jonctions intercellulaires et faiblement au niveau de la surface apicale, entraînerait la mobilisation des leucocytes au niveau des jonctions endothéliales pour permettre la diapédèse paracellulaire (Muller, 2003). Les leucocytes peuvent également réaliser leur diapédèse de manière transcellulaire en transperçant les cellules endothéliales (Feng *et al.*, 1998), bien que ce phénomène ne semble concerner que 5 à 20% des diapédèses leucocytaires. Pour cela, les lymphocytes utilisent des podosomes (microdomaines d'adhérence formés au niveau de la membrane, possédant un cœur d'actine encerclé de protéines structurales, de signalisation, et de métalloprotéases) afin de « palper » la surface des cellules endothéliales, et former des pores à travers l'endothélium. La formation des podosomes pour la diapédèse transcellulaire des lymphocytes semble nécessaire puisque son blocage stoppe ce phénomène (Carman *et al.*, 2007).

Bien que l'interaction des leucocytes avec certaines molécules d'adhésion comme VCAM-1 ou ICAM-1 active les cellules endothéliales pour permettre l'ouverture de la BHE, l'interaction avec d'autres molécules d'adhésion, comme ALCAM (pour « Activated Leukocyte Cell Adhesion Molecule » ou CD166) aurait l'effet inverse et permettrait un rétrocontrôle en favorisant le maintien de l'intégrité de la BHE. En effet, ALCAM est indirectement lié aux molécules d'adhésions de la BHE, et favorise leur stabilité (Lécuyer *et al.*, 2017).

Ainsi, les interactions des cellules immunitaires avec l'endothélium vasculaire des lésions actives sont plutôt bien décrites. Cependant des zones d'ombre persistent sur les évènements précoces qui provoquent la rupture du privilège immun du SNC dans la SEP. Une composante intestinale et une implication des PC dans ces évènements précoces sont fréquemment évoqués.

2.4.4. L'hypothèse de l'implication des plexus choroïdes dans la SEP

Le privilège immun est une adaptation biologique consistant à protéger certains organes vitaux du système immunitaire, afin d'éviter qu'ils ne soient lésés en cas d'inflammation. Le SNC a longtemps été considéré comme possédant ce privilège immunitaire, grâce à la présence de la BHE qui l'isole du reste de l'organisme. Cependant, plusieurs éléments viennent modérer cette idée, et laissent penser que le SNC serait soumis à une surveillance immune via les PC. En effet, les LCR de patients sains contiennent environ 1000 à 3000 lymphocytes par millilitre (avec un ratio d'environ 3,5 LT CD4+ pour 1 LT CD8+). L'analyse de tissus de patients n'ayant aucune pathologie cérébrale avérée montre également la présence de ces lymphocytes au niveau du stroma des PC. Les molécules d'adhésion P- et E-sélectine sont également retrouvées au niveau des vaisseaux des PC (Kivisakk *et al.*, 2003). De plus, des cellules pouvant jouer le rôle de CPA sont également présentes. Parmi ces cellules, on retrouve des macrophages et des cellules dendritiques dans le stroma, ainsi que les cellules de Kolmer sur la paroi des PC (baignant ainsi dans le LCR) (Ransohoff and Engelhardt, 2012). De plus, des peptides de myéline sont retrouvés dans le LCR de patients sains (2 à 6ng par ml), et leur quantité est augmentée dans la SEP (Biber *et al.*, 1981; Warren, Catz and McPherson, 1983). En effet, les oligodendrocytes ne sont pas capables de recycler leur membrane, et sécrètent ainsi des vésicules membranaires riches en peptides de myéline. Ces vésicules sont en grande partie captées et dégradées par la microglie. En cas d'inflammation, la captation de ces vésicules par la microglie est inhibée, provoquant ainsi le transport de ces vésicules vers le LCR. Pour ces raisons, une augmentation de la concentration de peptides de myéline dans le LCR peut être observée avant tout phénomène de démyéliniation (Fitzner *et al.*, 2011). Ainsi, les CPA présentes dans le stroma et sur la surface des PC sont en contact constant avec les peptides de myéline présents dans le LCR.

Ces données ont conduit au développement de l'hypothèse d'une implication des PC lors de l'inflammation du SNC dans la SEP et ses modèles. Les PC étant un lieu de surveillance immunitaire de routine, une première vague de LT mémoire issue de l'immunité adaptative s'infiltrerait au niveau des PC. Ces LT pourraient être réactivés par les CPA présentes au niveau des PC (CPA qui sont en contact avec les peptides de myéline présents dans le LCR). Leur réactivation conduirait à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires permettant l'activation

vasculaire des vaisseaux méningés, et à l'infiltration d'une seconde vague plus agressive, dirigée contre les gaines de myéline (figure 13) (Ransohoff and Engelhardt, 2012).

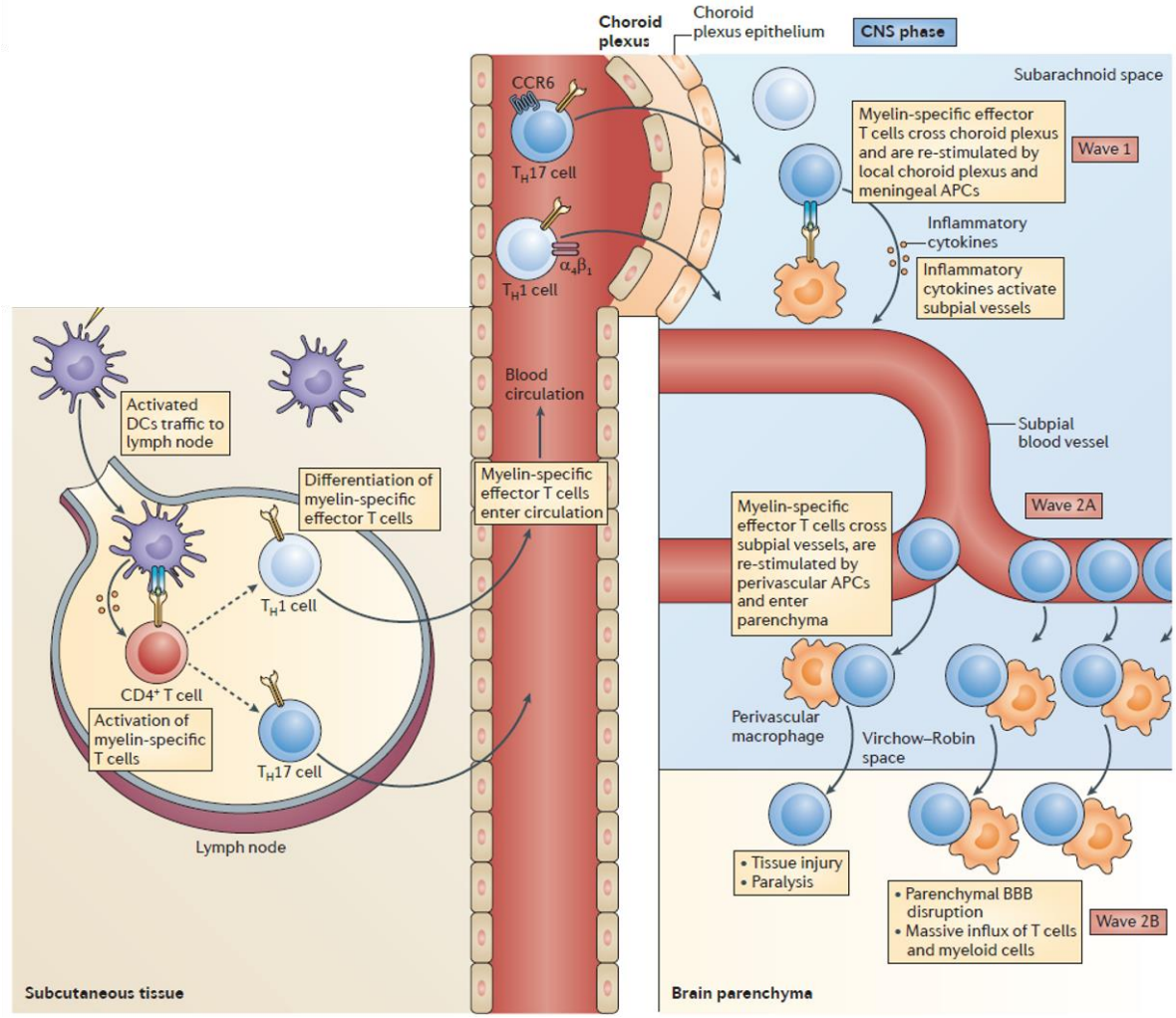


Figure 13 : Hypothèse de l'implication des plexus choroïdes dans la réaction auto-immune rencontrée dans la SEP et ses modèles : L'immunité adaptative conduit à l'infiltration à travers les PC d'une première vague de LT mémoire qui sont réactivé par les CPA. Leur réactivation conduit à l'expression de molécules pro-inflammatoires, entrainant l'activation des cellules endothéliales des vaisseaux méningés environnants. L'expression de molécules d'adhésion par les cellules endothéliales et la rupture de la BHE permet l'infiltration d'une seconde vague agressive dirigée contre les gaines de myéline (adapté de Ransohoff and Engelhardt, 2012).

Dans ce sens, il a été montré qu'une infiltration précoce de LT_H17 à travers les PC est présente dans un modèle de SEP (Reboldi *et al.*, 2009) et que le nombre de lymphocytes augmente au niveau des méninges et de l'espace sous-arachnoïdien avant que ce ne soit le cas dans le parenchyme (Kivisäkk *et al.*, 2009).

Bien que cette hypothèse explique le cheminement de l'infiltration des différentes vagues de cellules immunitaires dans le SNC lors de la SEP, elle n'explique pas pourquoi il y a chez les patients, des lymphocytes mémoire activés en périphérie contre des peptides de myéline. L'essor des travaux sur l'axe intestin-cerveau a conduit à de nouvelles hypothèses plaçant le système immunitaire intestinal comme pouvant être à l'origine de la déclaration d'une SEP.

2.4.5. L'hypothèse de l'axe intestin-cerveau

Plusieurs éléments vont dans le sens de liens étroits entre l'intestin et le SNC, et ont donné naissance au principe d'axe intestin-cerveau (Rhee, Pothoulakis and Mayer, 2009). Une augmentation du nombre de lésions dans la substance blanche a été observée chez les patients atteints de pathologies intestinales, comme la maladie de Crohn ou la colite ulcéreuse (Geissler *et al.*, 1995). Dans ce sens, un nombre plus important de SEP et de névrite optique est observé chez les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin (Gupta, Gelfand and Lewis, 2005). Inversement, les patients atteints de SEP sont plus susceptibles de développer une pathologie auto-immune de l'intestin (Langer-Gould *et al.*, 2010). Bien que les corrélations entre les pathologies inflammatoires de l'intestin et du cerveau puissent être dues à des gènes de susceptibilité communs, elles peuvent aussi s'expliquer par les similitudes de la composition et de l'architecture cellulaire entre la barrière intestinale (BI) et des barrières sanguines du SNC, mais également par l'action du microbiote intestinal sur l'inflammation.

2.4.5.1. Similitudes entre la barrière intestinale et la BHE

Les tissus intestinaux sont innervés par un important réseau nerveux, connu sous le nom de système nerveux entérique (Schemann and Neunlist, 2004). Parfois appelé « deuxième cerveau », le système nerveux entérique est présent dans la muqueuse intestinale et possède un nombre important de neurones, mais également de cellules gliales très proches des astrocytes, qui contrôlent l'activité neuronale (Savidge, Sofroniew and Neunlist, 2007), et l'intégrité de la barrière intestinale (Savidge *et al.*, 2007). À l'image de la BHE et de la barrière sang-LCR, la BI possède une monocouche de cellules épithéliales polarisées reliées entre elles

par des jonctions serrées (figure 14). Cette dernière a la capacité de laisser passer les nutriments tout en bloquant l'entrée des agents pathogènes (Groschwitz and Hogan, 2009). Comme c'est le cas pour la BHE, la BI est altérée dans certaines conditions pathologiques, comme la colite ulcéreuse et la maladie de Crohn (Antoni *et al.*, 2014). Cette altération provoque l'entrée dans l'organisme d'agents pathogène et de peptides bactériens accompagnée d'une importante inflammation. Ainsi, la BI partage de nombreuses caractéristiques physiologiques et pathologiques avec la BHE et la barrière sang-LCR (Figure 14).

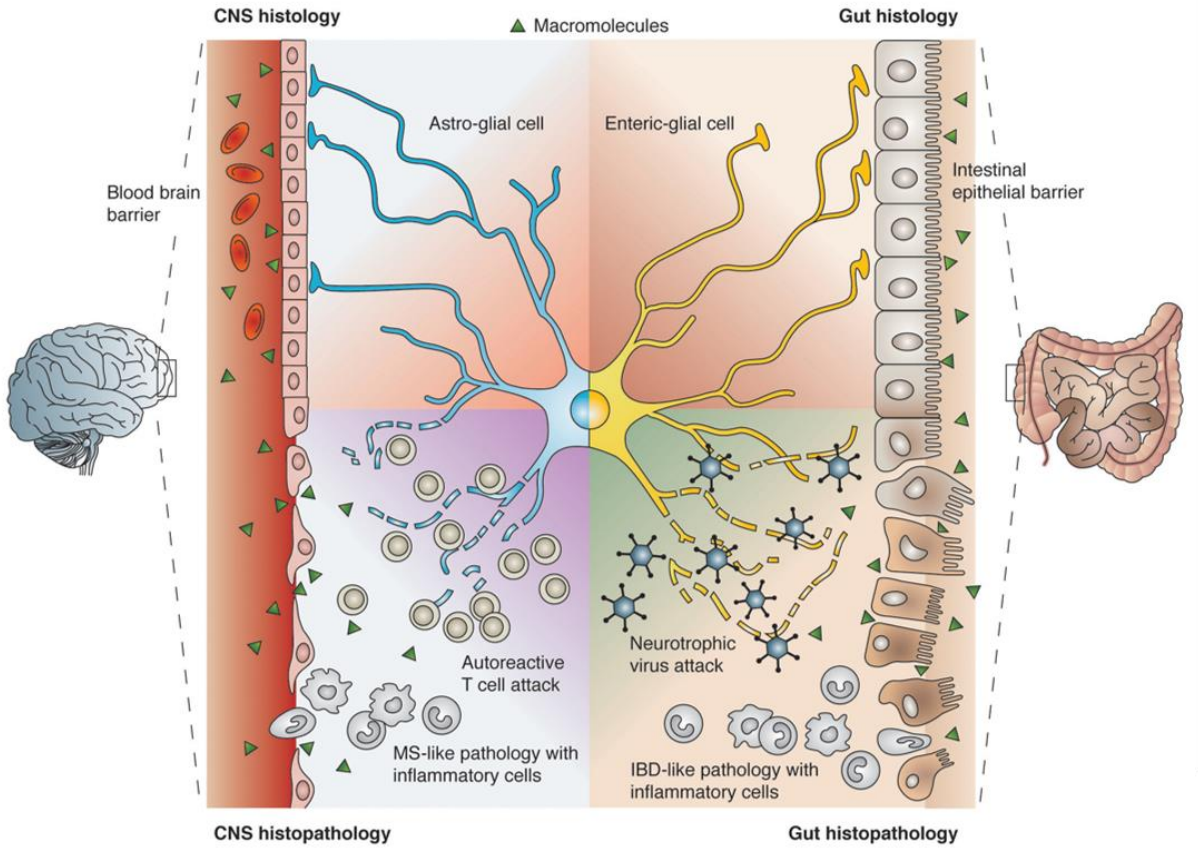


Figure 14 : Similitudes physiologiques et pathologiques de la barrière intestinale et de la barrière hémato-encéphalique. Les deux barrières sont caractérisées par une monocouche de cellules polarisées et reliées entre elles par des jonctions serrées. Que ce soit pour la BI ou la BHE, ce phénotype de barrière est contrôlé par des cellules gliales. En condition pathologique, une altération de ces barrières provoque une réaction inflammatoire et le passage incontrôlé de molécules et de cellules toxiques (Savidge, Sofroniew and Neunlist, 2007).

Les vaisseaux sanguins de l'intestin expriment également des molécules d'adhésion pour permettre la diapédèse des cellules immunitaires et ainsi soumettre l'intestin à une surveillance immunitaire, au même titre que les autres organes périphériques. MAdCAM-1 (pour « Mucosal vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1 ») est une molécule d'adhésion

exprimée par les vaisseaux de l'intestin, mais pas par ceux du cerveau. MAdCAM-1 interagit avec l'intégrine LPAM (pour « Lymphocyte Peyer patch adhesion molecule » composée des sous unités α_4 et β_7), qui a la particularité d'avoir la sous unité α_4 en commun avec VLA-4 (von Andrian and Engelhardt, 2003). Ainsi, le Natalizumab® (anticorps monoclonal dirigé contre α_4) qui est utilisé dans le traitement de la SEP, a également montré des effets bénéfiques dans les pathologies inflammatoires de l'intestin, comme la maladie de Crohn (Ghosh *et al.*, 2003).

2.4.5.2. Mimétisme moléculaire

L'hypothèse d'un mimétisme moléculaire dû à une homologie entre un peptide viral et un auto-antigène du SNC comme facteur déclenchant dans la SEP est envisagée depuis plusieurs années (Fujinami and Oldstone, 1985; Jahnke, Fischer and Alvord, 1985). La probabilité de trouver un peptide extérieur identique à un auto-antigène donné est de 20^n (20 fait référence au nombre d'acide-aminés possibles et n au nombre d'acide-aminés composant le peptide recherché). Ainsi, cette probabilité est presque nulle. Cependant, elle est en réalité fortement réduite car certains acide-aminés sont plus souvent rencontrés, comme la leucine et la glycine, et il n'est pas nécessaire d'avoir une homologie parfaite pour que deux peptides soit confondus (car les différents acides-aminés contribuent différemment à l'immunogénicité globale du peptide) (Westall, 2006).

Le microbiote intestinal, ensemble de micro-organismes résidant dans le tube digestif, est aujourd'hui connu pour jouer un rôle dans les fonctions digestive, immunologique et neurologique. On estime qu'il existe entre 400 et 1000 espèces différentes de bactéries résidant dans l'intestin, correspondant à environ 10^{11}-10^{12} micro-organismes par gramme de tube digestif (soit presque 2 à 10 fois plus que le nombre de cellules du corps humain) (Rhee, Pothoulakis and Mayer, 2009; Antoni *et al.*, 2014). De manière intéressante, il semblerait que des peptides exprimés par ce microbiote puissent présenter un mimétisme moléculaire avec des peptides immunogènes liés à la SEP (Westall, 2006). De plus, il a été montré qu'une altération de la BI se produit dans un modèle animal de SEP progressive (Nouri *et al.*, 2014). Ainsi, une altération de la BI pouvant engendrer le passage d'un peptide bactérien présentant un mimétisme avec un anto-antigène du SNC, peut-être envisagée comme une possible cause du développement d'une SEP. En accord avec cette hypothèse, il a été montré que les animaux dépourvus de microbiote intestinal ne peuvent développer de réaction auto-immune contre

un peptide de myéline (Berer *et al.*, 2011), ou présentent une pathologie moins sévère (Lee *et al.*, 2011).

Ainsi, la démonstration de l'implication de l'intestin dans la physiopathologie de la SEP s'avère intéressante dans l'élaboration de nouvelles stratégies thérapeutiques et diagnostiques.

2.5. Diagnostic de la SEP

La première poussée est appelée syndrome cliniquement isolé (SCI) et peut être mono- ou poly-symptomatique. Aujourd'hui la démarche diagnostique face à un malade présentant un SCI et suspecté d'être atteint d'une SEP consiste en la recherche d'une dissémination spatiale et temporelle des lésions détectées lors des différents examens. Depuis 2001, l'IRM occupe une place majeure dans le diagnostic de la SEP (McDonald *et al.*, 2001). Pour cela les neurologues ont à leur disposition différentes séquences IRM permettant de voir des lésions de la substance blanche sous forme d'hypersignaux T2 ou FLAIR (pour « Fluid-attenuated inversion recovery ») ou d'hyposignaux T1. Les lésions sont considérées comme récentes (moins de 3 semaines) lorsqu'elles sont associées à une ouverture de la BHE, objectivée par une prise de contraste (hypersignal) en T1 après l'injection de gadolinium (figure 15).

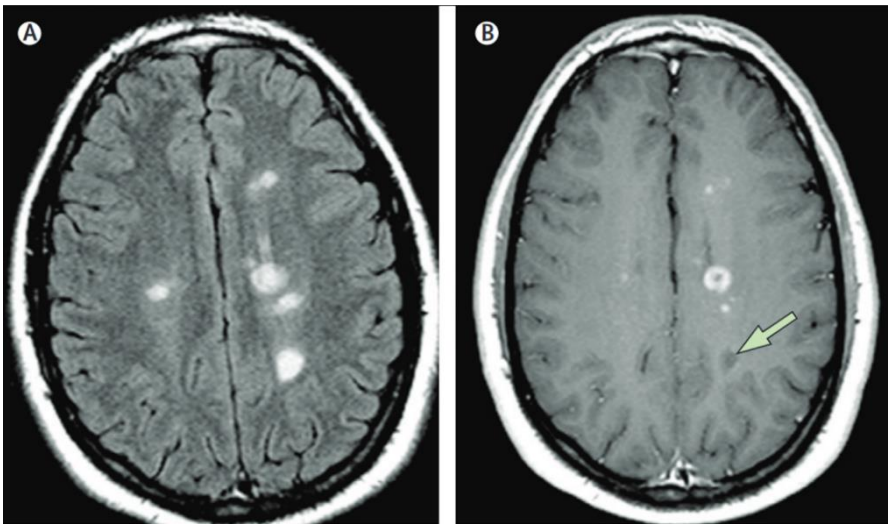


Figure 15 : IRM du cerveau d'un patient atteint de SEP. (A) Image axiale, FLAIR. Plusieurs lésions rondes et ovoïdes sont visibles en hypersignal. (B) Séquence pondérée en T1 après injection de gadolinium. Cette dernière montre la prise de contraste de la plupart des lésions, exceptée pour l'une d'entre elle (flèche) correspondant certainement à une ancienne lésion (Filippi et al., 2012).

Les critères de McDonald révisés en 2010 autorisent le diagnostic de la SEP en un seul examen IRM, afin d'accélérer le diagnostic sans perdre en sensibilité et en spécificité (Polman

et al., 2011). Ainsi, pour diagnostiquer la SEP dès la première poussée grâce à l'IRM, il est nécessaire de voir des lésions situées à des endroits différents (dissémination spatiale) mais également d'âges différents (objectivé par la prise de contraste de certaines d'entre elles). Si ces conditions ne sont pas réunies (ce qui est fréquent lors de la première poussée), il faudra attendre une seconde poussée pour pouvoir diagnostiquer de façon certaine une SEP. Pour ces raisons, le diagnostic de la SEP peut parfois prendre plusieurs années.

Les lésions de l'encéphale touchent fréquemment le nerf optique, mais sont également souvent péri-ventriculaires, juxta-corticales et infratentorielle. Elles sont fréquemment de forme ronde ou ovoïdale et perpendiculaire au corps calleux. Le rehaussement des lésions après injection de gadolinium se présente sous forme d'anneaux plus ou moins complets. Des lésions de la moelle épinière sont retrouvées chez plus de 80% des patients (Bot *et al.*, 2004), dont près d'un tiers sont asymptomatiques (O'Riordan *et al.*, 1998) (figure 16).

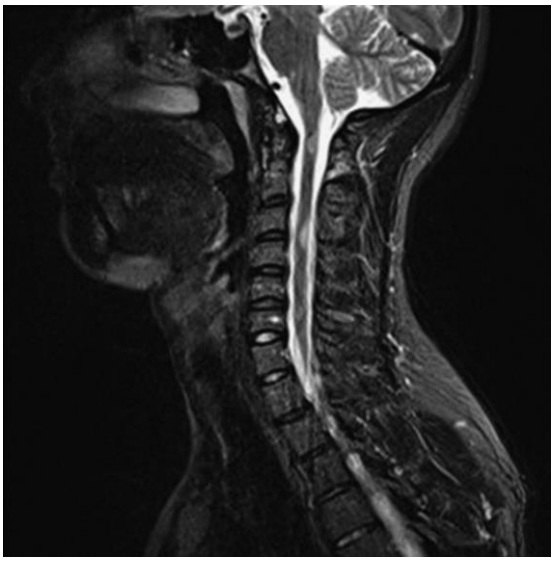


Figure 16 : IRM sagittale pondérée en T2 de la moelle épinière cervicale d'un patient atteint de SEP. L'examen IRM du patient révèle 3 lésions visible en hypersignal et localisées entre C1 et C6 (Salinas-González et al., 2016).

Les lésions de la moelle épinière sont rarement rehaussées en T1 après injection de gadolinium, et peinent ainsi à objectiver une dissémination temporelle des lésions. Bien que le suivi des lésions de la moelle épinière ne soit pas recommandé pour objectiver la dissémination spatiale et temporelle (Rovia À et al., 2015), il permet un diagnostic différentiel avec d'autres pathologies présentant des symptômes d'une affection de la moelle épinière. Par exemple, la neuromyélite optique (ou maladie de Devic) présente des lésions de la moelle épinière, mais ces dernières sont plus étendues (>3 segments vertébraux) que celles rencontrées dans la SEP (<3 segments).

La réalisation d'une ponction lombaire et l'étude du LCR peuvent également être utilisées lors du diagnostic d'une SEP afin de confirmer la présence d'une inflammation du SNC en écartant une piste infectieuse. La présence de bandes oligoclonales permet de mettre en évidence une production intrathécale anormale d'immunoglobulines. Bien qu'elle soit de moins en moins réalisée dans les formes récurrentes-rémittentes, cette technique l'est encore fréquemment pour les formes progressives primaires qui sont plus difficiles à diagnostiquer avec l'IRM seule.

En résumé, bien que l'IRM ait révolutionné le diagnostic de la SEP, elle possède encore de nombreuses limitations, pouvant engendrer dans certains cas une errance diagnostique de plusieurs années. Cependant, la recherche préclinique, qui utilise des modèles animaux mimant la SEP humaine, a permis de mieux comprendre sa physiopathologie et a conduit à l'élaboration de nouvelles modalités d'IRM prometteuses dans l'amélioration du diagnostic.

3. Les outils utilisés dans l'étude de la SEP en recherche préclinique

3.1. Les modèles animaux

3.1.1. Utilité des modèles animaux

La SEP est une maladie confuse dans laquelle interagissent deux systèmes biologiques des plus complexes que sont le SNC et le système immunitaire. Bien que l'utilisation de modèles *in vitro* soit importante dans l'étude de mécanismes précis, l'utilisation de modèles *in vivo* permet d'appréhender la pathologie dans sa globalité grâce à l'utilisation d'un organisme complet. Les modèles animaux ont déjà permis l'élaboration de traitements utilisés en clinique dans la SEP. Sont aujourd'hui majoritairement utilisés : des modèles viraux, des modèles génétiques, des modèles toxiques et des modèles induits par immunisation. Les principes, les points forts et les points faibles de ces différents modèles seront présentés ci-dessous.

3.1.2. Modèles murins

3.1.2.1. Modèles viraux

Une grande variété de virus à ARN peut causer une démyélinisation du SNC, comme le virus de Theiler, le virus de la forêt de Semliki et le virus de l'hépatite murine. Le virus de Theiler, qui est le plus utilisé d'entre eux, est un petit virus de 8100 nucléotides, décrit pour la première fois par Theiler en 1937 (Theiler, 1937). Une fois injecté dans le cerveau d'une souche de souris génétiquement susceptible comme la SJL, le virus induit deux phases pathologiques distinctes : la première, qui commence 3 à 12 jours après l'injection, consiste en la réplication du virus et touche principalement les neurones, alors que la seconde phase, arrivant environ un mois après, est caractérisée par des phénomènes de démyélinisation et de remyélinisation accompagnés de dommages axonaux (McGavern *et al.*, 2000; Pachner, 2011). Lors de cette phase tardive de démyélinisation chronique, a lieu une infiltration de cellules immunitaires dans le SNC. Parmi ces cellules, sont majoritairement retrouvés des LT CD4+ et CD8+, des macrophages, et quelques LB.

Cependant, ces modèles diffèrent de la SEP dans la mesure où l'infection par le virus persiste après l'injection. Bien que l'apparition d'une SEP suite à la contamination par un virus est envisagée chez l'Homme, la persistance de l'infection virale dans le SNC n'est pas démontrée (Ransohoff, 2012).

3.1.2.2. Les modèles génétiques

L'essor du génie génétique a permis l'élaboration d'animaux génétiquement modifiés présentant des anomalies de structure de la myéline et des phénomènes de démyélinisation et de remyélinisation. Par exemple, l'utilisation d'un promoteur spécifique permet l'expression du récepteur de la toxine diphtérique par un type cellulaire particulier et l'injection de la toxine diphtérique permet l'ablation du type cellulaire ciblé (Saito *et al.*, 2001). Ainsi, l'injection de toxine diphtérique chez des souris exprimant spécifiquement le récepteur dans les oligodendrocytes conduit à une démyélinisation dans le SNC. Cette démyélinisation entraîne une ataxie et des tremblements dus à une conduction axonale altérée dans la moelle épinière. De manière intéressante, les animaux récupèrent après quelques jours grâce à une remyélinisation spontanée (Traka *et al.*, 2010).

Les modèles génétiques encore récents sont peu utilisés. Une meilleure caractérisation de ces modèles est nécessaire pour évaluer tout leur potentiel. Par exemple, il serait très intéressant de savoir si l'apoptose induite des oligodendrocytes suffit à créer une réaction immunitaire dirigée contre des auto-antigènes de myéline (Ransohoff, 2012).

3.1.2.3. Modèles de démyélinisation par des agents chimiques

Deux modèles de démyélinisation induits par un agent chimique sont majoritairement utilisés. Le premier consiste en l'administration orale de cuprizone, entraînant une mort des oligodendrocytes et une démyélinisation spécifique du SNC chez les souris de souches susceptibles, comme les C57BL/6. Le mécanisme d'action de la cuprizone est mal connu, mais il semblerait qu'il provoque une perturbation du bon fonctionnement des mitochondries des oligodendrocytes, sans toucher celles des autres cellules du SNC. La sensibilité accrue des oligodendrocytes à la cuprizone peut s'expliquer par le fait qu'ils ne possèdent pas de réserves de glycogène et ont un besoin énergétique très élevé pour le maintien de la myéline. La mort des oligodendrocytes est observée 3 semaines après le début du traitement à la cuprizone. De manière intéressante, toutes les régions ne sont pas touchées de la même façon. Alors que le corps calleux y est très sensible, les gaines de myéline présentes sur le nerf optique et dans la moelle épinière sont épargnées. L'arrêt du traitement à la cuprizone provoque une remyélinisation spontanée des fibres nerveuses (Matsushima and Morell, 2006) (figure 17).

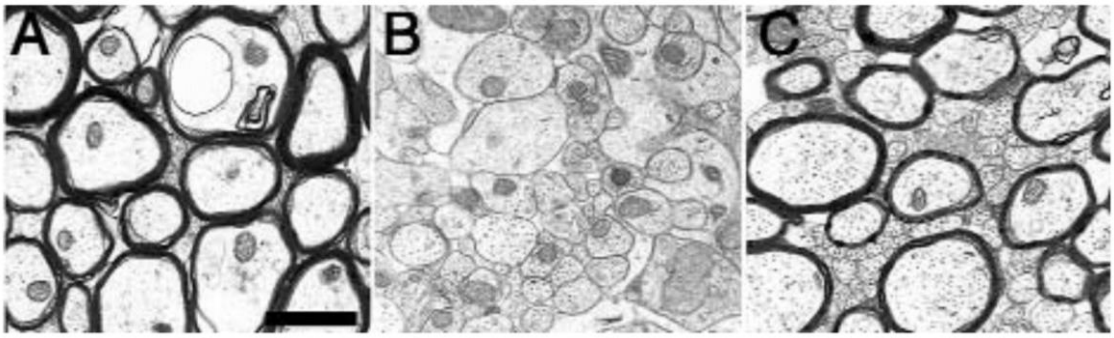


Figure 17 : L'observation de la structure de la myéline au microscope électronique montre la démyélinisation et la remyélinisation des axones dans le corps calleux des souris traitée à la cuprizone. (A) Souris normale non traitée. La myéline entourant les axones est visible en noir. (B) Démyélinisation complète chez une souris traitée à la cuprizone. (C) Remyélinisation après arrêt du traitement. Barre d'échelle=1,2µm. (Matsushima and Morell, 2006)

De façon intéressante, il a été montré dans ce modèle que les phénomènes de démyélinisation et de remyélinisation se chevauchent. Ces deux phénomènes n'interviennent pas l'un après l'autre, le recrutement et la prolifération des progéniteurs d'oligodendrocytes commençant pendant la démyélinisation (Stidworthy *et al.*, 2006).

Bien que ce modèle soit utile pour étudier spécifiquement les phénomènes de démyélinisation et de remyélinisation, ce dernier présente des différences avec la SEP rencontrée chez les patients, comme l'absence de réaction auto-immune et d'ouverture de la BHE (McMahon, Suzuki and Matsushima, 2002). Ainsi, ce modèle n'est pas préconisé dans l'étude de l'infiltration de cellules immunitaires.

Le second modèle de démyélinisation chimique majoritairement utilisé dans la littérature scientifique consiste en l'injection de lysolécithine (ou moins fréquemment de bromure d'éthidium) dans une région de la substance blanche. Les injections de lysolécithine dans la moelle épinière de souris sont possibles (Hall, 1972; Ousman and David, 2000), bien que les injections dans le corps calleux soient plus souvent utilisées (Deloire-Grassin *et al.*, 2000; Ransohoff, 2012; Leonetti *et al.*, 2017). Dans ce modèle, et comme pour le modèle curpizone, une remyélinisation spontanée suit la démyélinisation. Cependant, le point fort de ce modèle et la prévisibilité spatiale et temporelle de la démyélinisation et de remyélinisation. De plus contrairement au modèle cuprizone, où l'importance de la démyélinisation va déprendre de la quantité ingérée (qui varie en fonction des souris), le modèle lysolécithine présente une taille de lésion très reproductible car dépendante de la quantité injectée par l'expérimentateur. Cependant, ce modèle possède comme principal point faible le fait que la lysolécithine est un détergeant non spécifique, pouvant induire des dommages à toutes les cellules présentes dans le site d'injection.

Une meilleure compréhension des processus de démyélinisation et de remyélinisation est un challenge important dans le traitement des SEP, principalement pour les formes progressives primaires, qui sont moins concernées par les phénomènes d'inflammation. Les modèles de démyélinisation induits par des molécules chimiques sont ainsi particulièrement préconisés dans l'étude de ces phénomènes.

3.1.2.4. Modèles auto-immuns

Les modèles auto-immuns de SEP sont regroupés sous le nom d'encéphalite auto-immune expérimentale (ou encéphalite allergique expérimentale, EAE). L'EAE est le modèle de SEP le plus utilisé dans la littérature scientifique. Elle a été découverte il y a 90 ans, en constatant que certaines personnes développaient des encéphalites après avoir été vaccinées contre la rage. En effet, les vaccins contre la rage ont longtemps été préparés à partir de tissus nerveux. En 1925, cette encéphalite post-vaccinale a été imitée chez l'animal par Koritschoner et Scweinburg, en injectant des débris de moelle épinière humaine chez des lapins (Pachner, 2011). Au fil des années, les similitudes entre ce modèle d'encéphalite, aujourd'hui appelé EAE et la SEP humaine l'ont placé au rang de modèle le plus utilisé dans la recherche sur la SEP. Par la suite, les broyats de myéline ont été remplacés par des peptides immunogènes, injectés dans des souches de souris génétiquement susceptibles. Les peptides issus de la PBM ont été les premiers à être utilisés, suivis par la PLP et la glycoprotéine oligodendrogliale de la myéline (MOG) (Ransohoff, 2012).

Aujourd'hui, l'EAE la plus utilisée consiste en l'injection d'un mélange de peptide MOG_{35-55} et d'adjuvant complet de Freund (ACF) sur des souris C57BL/6 mâles. Dix à douze jours après l'injection, les souris développent une paralysie de l'arrière-train s'aggravant progressivement, sans récupération complète. Ainsi, ce modèle mime la forme primaire progressive de la SEP. En fonction du peptide et de la souche utilisés, les souris vont développer des formes différentes d'EAE. L'injection de $PLP_{139-151}$ sur des souris SJL/J femelles provoque des poussées d'aggravations cliniques espacées par des récupérations de plusieurs jours, mimant ainsi la forme récurrente-rémittente rencontrée chez l'Homme (McRae *et al.*, 1992).

Il est également possible d'induire une EAE dite « passive » sur une souris naïve par le transfert adoptif de lymphocytes T prélevés dans les ganglions lymphatiques d'une souris ayant subi une EAE active (PATERSON, 1960). Le principal avantage de cette technique est de pouvoir marquer les cellules avant leur transfert, afin de pouvoir suivre leur cheminement dans la souris receveuse (Stromnes and Goverman, 2006). De plus, grâce à l'EAE passive, il est possible de traiter les cellules in vitro avec un agent thérapeutique avant leur injection dans les souris receveuses, afin d'évaluer l'effet de cette molécule sur la capacité des lymphocytes à induire la maladie.

Un des inconvénients majeur de l'EAE classique, est que l'auto-immunité est provoquée par une immunisation, incluant de puissants adjuvants. Ainsi, ce modèle ne permet pas d'étudier les éléments déclencheurs de l'apparition d'une SEP. L'utilisation de l'EAE spontanée chez des souris transgéniques exprimant un TCR (récepteur des cellules T) spécifique de la myéline permet cependant de pallier ce problème (Goverman *et al.*, 1993). Chez ces animaux, l'EAE se développe spontanément, sans avoir recours à une immunisation ou au transfert de lymphocytes activés.

Dans l'EAE, les zones d'infiltration et de démyélinisation dans l'EAE peuvent se développer à n'importe quel endroit du SNC et leur survenue est imprévisible. Ainsi, bien que l'utilisation de ce modèle soit essentielle dans l'étude de l'inflammation, elle est moins préconisée dans l'étude des phénomènes de démyélinisation et de remyélinisation. Malgré cela, la physiopathologie de l'EAE étant très proche de celle de la SEP, ce modèle a permis d'améliorer considérablement nos connaissances sur cette maladie. Un des traitements majeur de la SEP, le natalizumab (tysabri), a été développé à par partir des recherches sur l'EAE (Yednock *et al.*, 1992).

Modèle	Avantages	Inconvénients
Modèles viraux	Démyélinisation chronique	Contraignant (manipulation du virus) Persistance de l'infection virale
Modèles génétiques	Atteintes spécifiques des oligodendrocytes Remyélinisation spontanée	Non adapté à l'étude de la BHE et de l'infiltration
Cuprizone	Facilité d'utilisation (administration orale) Démyélinisation suivie d'une remyélinisation spontanée	Non adapté à l'étude de la BHE et de l'infiltration Variabilité entre les animaux
Lysolécithine	Démyélinisation suivie d'une remyélinisation spontanée Prévisibilité spatiale et temporelle de la démyélinisation Grande reproductibilité	Lysolécithine non spécifique des oligodendrocytes Nécessite une lourde chirurgie (craniotomie) Non adapté à l'étude de la BHE et de l'infiltration
EAE	Proche de la pathologie humaine Particulièrement adaptée à l'étude de la BHE et de l'infiltration	Nécessite une immunisation avec de puissants adjuvants Imprévisibilité spatiale et temporelle des lésions

Table 3 : Avantage et inconvénients des différents modèles murins utilisés dans l'étude de SEP.

3.1.3. Autres espèces

Bien que les modèles murins soient plus couramment utilisés dans la recherche sur la SEP, d'autres espèces peuvent être utilisées dans certains cas précis. Ainsi, le recours à des primates non-humains peut-être intéressant grâce à leur proximité génétique avec l'Homme. Il est donc possible d'induire une EAE sur des macaques ou des marmousets afin d'évaluer avec plus de fiabilité l'efficacité thérapeutique ou l'innocuité d'un traitement destiné à

l'Homme (Raine *et al.*, 1999). Il est également possible d'induire de la démyélinisation chez le macaque grâce à l'injection de lysolécithine dans le nerf optique ou dans la moelle épinière (Lachapelle *et al.*, 2006). Cependant, les coûts, les infrastructures nécessaires et les aspects éthiques rendent l'expérimentation sur les primates bien plus contraignante que celle sur les souris et ne permet ainsi pas de réaliser un criblage de molécules thérapeutiques.

L'utilisation de petits animaux aquatiques génétiquement modifiés permet de faciliter ce dernier. La larve de poisson zèbre et le têtard sont majoritairement utilisés car ils sont peu chers, transparents et leur composition en myéline est similaire à celle des mammifères. De plus, avec ses 300 œufs par ponte pour le poisson zèbre, et 3000 pour le Xénope, la transgénèse est très efficace. Afin d'étudier la démyélinisation, des lignées de ces animaux permettant l'ablation conditionnelle des oligodendrocytes myélinisants ont été créées. La portion proximale de la séquence régulatrice de la PBM spécifique des oligodendrocytes contrôle l'expression d'une protéine transgénique fluorescente et toxique en présence de métronidazole. Ainsi, en présence de métronidazole, qui est simplement ajouté à l'eau, la protéine recombinante spécifiquement exprimée par les oligodendrocytes va produire un dérivé toxique entraînant leur mort, et donc une démylinisation. Après l'arrêt du traitement au métronidazole, une remyélinisation spontanée se produit. La transparence de l'animal permet l'observation de la demyélinisation et de la remyélinisation à l'aide d'un microscope. A la fin de la demyélinisation, les animaux sont placés dans une eau contenant la molécule à tester afin d'évaluer l'amélioration de la remyélinisation (Buckley, Goldsmith and Franklin, 2008; Kaya *et al.*, 2012).

En plus de son intérêt dans l'amélioration de la compréhension de la physiopathologie de la SEP, l'utilisation des modèles animaux a permis le développement de techniques prometteuses d'IRM moléculaires capables de mesurer l'inflammation. Les principes et les applications potentielles de l'IRM moléculaire de l'inflammation seront détaillés dans la partie si dessous.

3.2. L'IRM moléculaire de l'inflammation

Les interactions entre les cellules immunitaires et la BHE jouent un rôle primordial dans la pathophysiologie de la SEP, comme le montre l'efficacité des stratégies thérapeutiques ciblant ces dernières. A ce jour, il n'existe pas de marqueur non invasif disponible en clinique permettant de visualiser l'inflammation du SNC. Le développement récent de nouveaux agents de contraste compatibles avec l'IRM a permis l'essor de l'imagerie moléculaire, permettant la visualisation *in vivo* de l'expression des molécules d'adhésion avec une bonne résolution spatiale et temporelle.

3.2.1. Principes

L'IRM préclinique utilise différents agents de contraste pouvant être utilisés pour détecter l'inflammation du SNC et l'infiltration des leucocytes à travers la BHE, comme le 5HT-DTPA (Gadolinium) visible en hypersignal sur les séquences pondérées en T1, ou les USPIOs (pour « UltraSmall Particles of Iron Oxide ») et les MPIOs (pour « MicroParticle of Iron Oxide ») tous deux visibles en hyposignal T2*. Les avantages et les inconvénients de chacun de ces agents de contraste sont discutés ci-dessous.

Le 5HT-DTPA est un agent de contraste contenant du gadolinium qui est un substrat de la myéloperoxydase (MPO, une enzyme produite par les neutrophiles et les macrophages). Une fois oxydées, les molécules d'agent de contraste possèdent un électron non-apparié, et vont ainsi se polymériser entre elles, provoquant une accumulation de Gadolinium dépendante de l'activité de la MPO, et donc de l'infiltration de neutrophiles/macrophages (Breckwoldt *et al.*, 2008). Néanmoins, l'efficacité de cet agent de contraste est dépendante de l'importance de l'altération de la BHE. Ainsi, le niveau du signal sera fonction de la capacité du traceur à passer la BHE et de la quantité de MPO présent dans le tissu. Deux situations différentes peuvent donc donner un signal semblable, par exemple (i) en cas de forte augmentation de perméabilité de la BHE accompagnée d'une faible expression de MPO, et (ii) en cas de faible augmentation de perméabilité de la BHE avec une forte expression de MPO (Gauberti *et al.*, 2014).

Les USPIOs sont des nanoparticules d'environ 30nm qui une fois injectées par voie intraveineuse, sont phagocytées par les monocytes circulants en raison de leur longue durée de vie plasmatique (>12h) (Corot *et al.*, 2004). Les monocytes qui phagocytent des USPIOs dans la circulation et s'infiltrent dans le parenchyme cérébral sont visibles en IRM grâce à une diminution du signal sur les séquences pondérées en T2*. Cependant, l'extrême petite taille de ces particules leur permet d'entrer dans le parenchyme cérébral de manière passive en cas d'altération de la BHE (tel est parfois le cas dans la SEP). La spécificité de cette technique s'en voit ainsi réduite. De plus, les USPIO doivent être injectés 24h avant l'examen IRM, rendant la technique plus contraignante en clinique. Enfin, il faut qu'un grand nombre de monocytes s'infiltre dans une région donnée pour que ces derniers soient détectables, ce qui est rarement le cas dans la phase précoce de l'inflammation.

Il est également possible de coupler les USPIOs à des anticorps afin de les rendre spécifiques d'une molécule d'intérêt, comme par exemple des molécules d'adhésion VCAM-1 (Fréchou *et al.*, 2013) ou E-sélectine (Reynolds *et al.*, 2006; Chapon *et al.*, 2009). Cependant, au même titre que les UPIOs seules, ces dernières peuvent diffuser de manière passive dans le parenchyme cérébral en cas d'altération de la BHE. Ainsi, en cas de signal détecté, il sera difficile de déterminer si ce dernier est dû à une ouverture de la BHE, à une activation vasculaire, à l'infiltration de monocytes, ou à plusieurs de ces éléments.

Les MPIOs sont beaucoup plus grosses (1,08 µm) que les USPIO et sont également utilisées en IRM préc-clinique pour visualiser l'inflammation du SNC chez l'animal (McAteer *et al.*, 2007). Ces billes sont couplées à un anticorps spécifique d'une protéine d'adhésion vasculaire, permettant de les visualiser en hyposignal sur les séquences pondérées en T2*. De par leur grande taille, les MPIOs ne peuvent pas traverser la BHE, même altérée, ce qui les rend spécifiques de l'activation vasculaire. De plus, leur demi-vie vasculaire est très courte (environ 35 secondes) en raison d'une rapide fixation non spécifique dans le foie et la rate (Melemenidis *et al.*, 2015). Ainsi, quelques minutes après leur injection i.v., tous les MPIOs qui ne se sont pas fixées sur les vaisseaux sont éliminées de la circulation (contre plusieurs heures pour les USPIO). Cette courte demie-vie et leur rapide fixation sur leur cible permettent de commencer l'examen IRM de l'animal seulement quelques minutes après leur injection. Les MPIOs contiennent une importante quantité de fer (généralement 0,1-1,6 pg de fer / MPIO) ce qui est, proportionnellement à leur taille, plus important que les USPIO. Ainsi, une MPIO

provoque une chute de signal sur un diamètre 50 fois supérieur à sa taille, la rendant détectable en IRM, sans nécessiter de forte accumulation de ces derniers.

Pour résumer, contrairement aux autres techniques d'IRM moléculaire, l'utilisation des MPIOs permet de visualiser l'expression des molécules d'adhésion avec une grande résolution spatio-temporelle, de manière indépendante du degré d'altération de la BHE (figure 18).

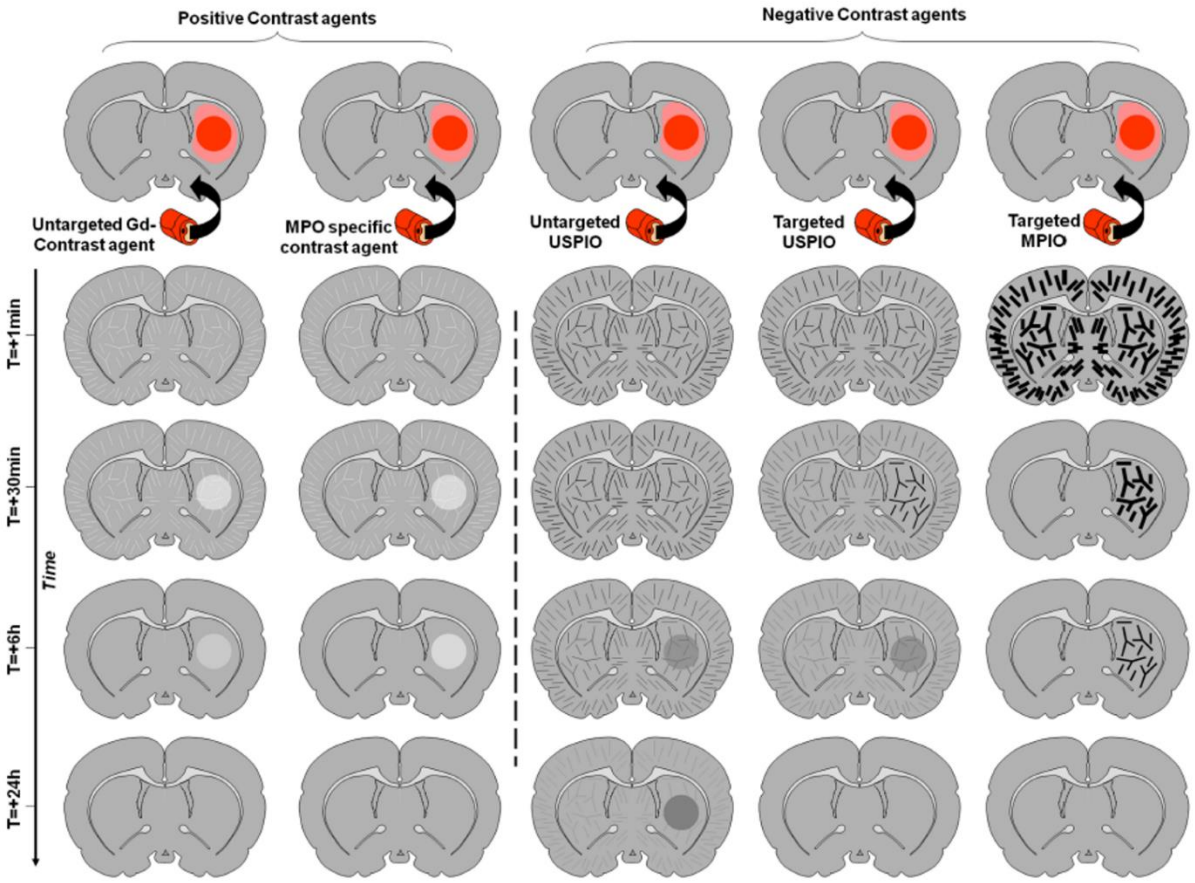


Figure 18 : Schéma résumant les effets des différents agents de contraste utilisés dans l'IRM moléculaire de l'inflammation (cerveau de rongeur). La région inflammatoire touchée par une altération de la BHE est représentée en rouge foncée, et celle épargnée par l'altération de la BHE est représentée en rouge clair. Les MPIOs produisent un signal indépendant de l'altération de la BHE, alors que les autres agents de contraste produisent un signal qui n'est pas seulement spécifique de l'inflammation, mais dépend aussi de l'altération de la BHE (Gauberti et al., 2014).

3.2.2. Utilisation des MPIOs

L'utilisation de l'IRM moléculaire n'est pas nouvelle puisqu'elle remonte à plus de 10ans. Cependant, les récentes avancées en matière d'imagerie ont permis d'améliorer considérablement la résolution spatiale de cette technique, initialement de basse qualité (figure 19).

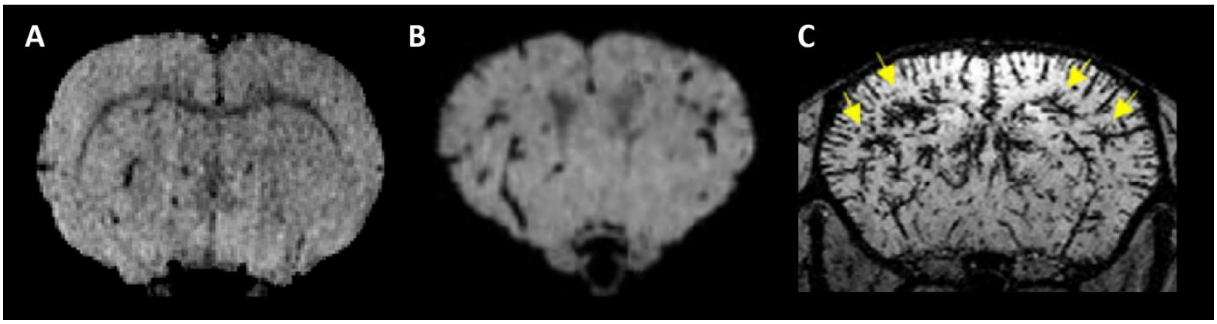


Figure 19 : Evolution de la qualité des images d'IRM moléculaire (cerveaux de souris EAE). (A) MPIOs-αP/E-sélectine dans l'EAE MOG (van Kasteren et al., 2009). (B) MPIOs-αVCAM-1 dans l'EAE PLP (Serres et al., 2011). (C) MPIOs-αVCAM-1 dans l'EAE MOG (Montagne et al., 2012).

L'IRM moléculaire a été majoritairement utilisée avec des MPIOs-αVCAM-1 dans des modèles animaux de maladie du SNC, comme les accidents vasculaires cérébraux (Hoyte *et al.*, 2010; Gauberti *et al.*, 2013), la maladie d'Alzheimer (Montagne *et al.*, 2012) mais également dans l'EAE (Serres *et al.*, 2011; Montagne *et al.*, 2012; Mardiguian *et al.*, 2013). L'absence de marquage chez les souris injectées avec des MPIOs couplés à des IgG contrôles confirme l'absence d'extravasation des billes même en cas d'altération de la BHE. Les MPIOs-αVCAM-1 permettent ainsi une mesure qualitative et quantitative de l'activation vasculaire aux stades avancés des différents modèles de pathologies cérébrales (figure 20).

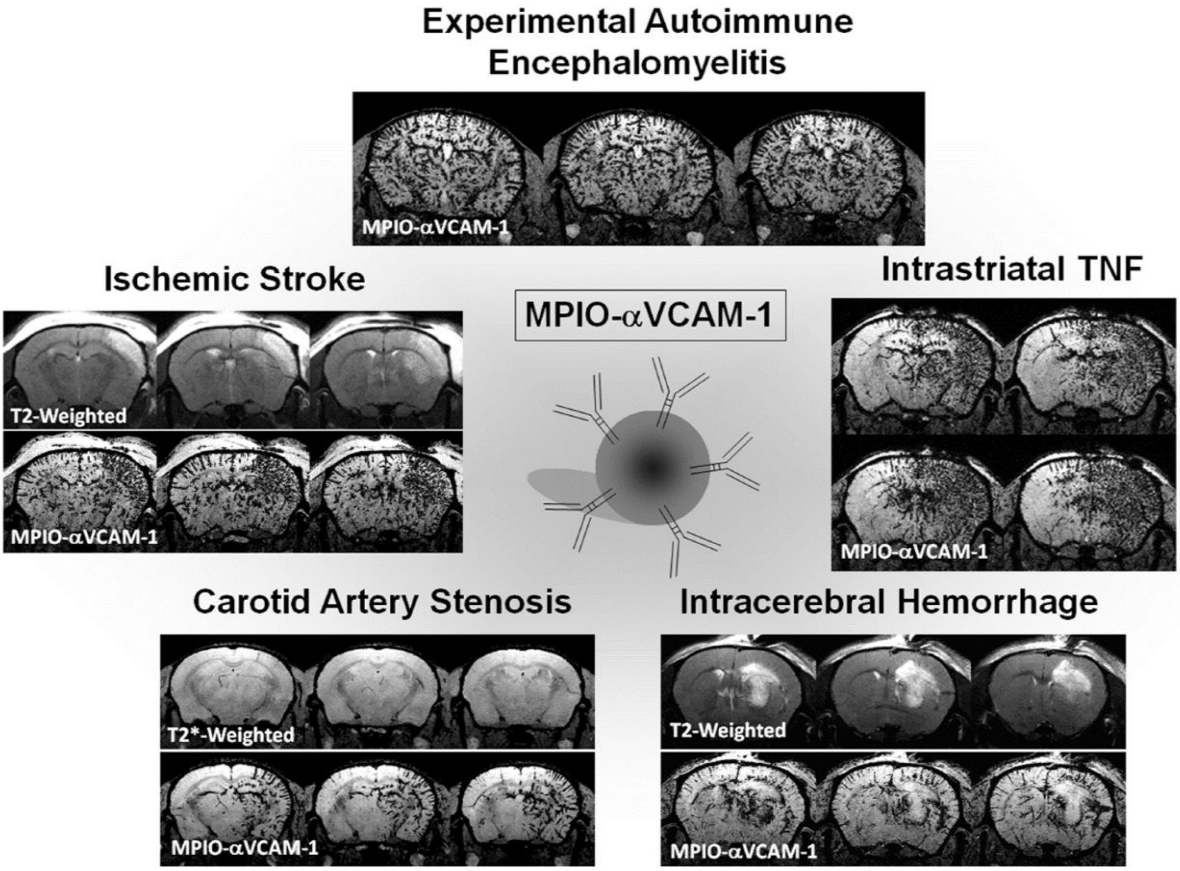


Figure 20 : Exemple d'IRM moléculaire de VCAM-1 dans le cerveau de modèles de pathologies cérébrales (Gauberti et al., 2014).

Au contraire, il a été montré, dans un modèle d'accident ischémique transitoire, que l'expression de la P-sélectine est, dans un contexte d'inflammation précoce et silencieuse, plus prématurée que celle de VCAM-1 (Quenault *et al.*, 2017). Ainsi, dans un contexte d'inflammation précoce et légère, les MPIO-αP-sélectine se sont montrées plus efficaces que les MPIOS-αVCAM-1. Ceci peut s'expliquer par le fait que la P-sélectine est exprimée de manière constitutive dans les corps de Weibel-Palade des cellules endothéliales. Lorsque ces cellules subissent un stress, le contenu des corps de Weibel-Palade est sécrété et la P-sélectine est redistribuée au niveau membranaire.

L'expression de molécules d'adhésion n'étant pas confinée au cerveau, l'imagerie moléculaire permet aussi de détecter l'activation vasculaire dans d'autres pathologies inflammatoires des organes périphériques tels que les reins ou le cœur (Belliere *et al.*, 2015). Bien que la moelle épinière soit une zone du SNC particulièrement touchée dans l'EAE (Ajami

et al., 2011), aucune image d'IRM moléculaire la concernant n'est présente dans la littérature scientifique. Cette absence peut s'expliquer par la petite taille de l'organe et par la difficulté due à la par la sensibilité aux mouvements des séquences utilisées dans ce type d'imagerie.

OBJECTIFS

Détection de l'expression de la P-sélectine dans l'EAE avec l'IRM moléculaire :

À l'heure actuelle, l'IRM est devenue l'outil incontournable pour le diagnostic de la SEP. Cependant, elle n'est pas capable de mesurer le niveau d'inflammation du SNC. Le seul moyen d'avoir accès à cette information nécessite la réalisation d'une ponction lombaire, qui n'est pas sans risque de complications. Bien que l'IRM ait considérablement amélioré le diagnostic de la SEP, le peu d'informations qu'elle apporte peine encore à faire un diagnostic précoce et à prédire l'évolution de la maladie.

La démyélinisation, qui est à l'origine des symptômes, est précédée d'une infiltration de cellules immunitaires et d'une activation vasculaire. En cas d'inflammation, la P-sélectine, qui est stockée dans les corps de Weibel Palade est rapidement sécrétée à la surface des cellules endothéliales. La détection de ce phénomène, grâce à l'utilisation de l'IRM moléculaire de la P-sélectine, permettrait ainsi d'apporter des informations complémentaires nécessaires au diagnostic précoce de la SEP.

Objectifs des travaux présentés dans cette thèse (ARTICLE 1):

- Mettre au point une méthode IRM permettant de visualiser l'activation vasculaire dans la moelle épinière de souris soumises à deux modèles de SEP
- Juger la valeur prédictive de cette technique pour l'apparition des poussées et des rémissions d'un modèle de SEP récurrente-rémittente

Détection de l'inflammation intestinale avec l'IRM moléculaire :

L'intestin et le cerveau possèdent de nombreuses similitudes physiologiques et pathologiques. Comme pour le cerveau, l'intestin peut lui aussi être touché par des pathologies inflammatoires. Le diagnostic de ces pathologies intestinales avec l'IRM est difficile, voire pour certaines d'entre elles impossible. De plus, une composante intestinale semble jouer un rôle dans pathophysiologie de la SEP. Ainsi, le développement d'une technique d'IRM moléculaire spécifique de l'intestin pourrait considérablement améliorer le suivi de l'inflammation intestinale dans ces différentes pathologies.

Objectifs des travaux présentés dans cette thèse (Partie 2 des résultats):

- Mettre au point une méthode permettant de visualiser l'activation vasculaire dans l'intestin de souris soumises à différents modèles de pathologies intestinales
- Utilisation de cette technique afin de démasquer l'inflammation intestinale d'un modèle de SEP récurrente-rémittente

Etude de la perfusion du système glymphatique dans l'EAE :

L'activation vasculaire dans la SEP et l'EAE permet le recrutement de nombreuses cellules immunitaires, et l'ouverture de la BHE. Ces phénomènes pourraient être à l'origine d'une perturbation de la circulation du LCR périvasculaire, et ainsi d'une perturbation du fonctionnement du système glymphatique.

Objectifs des travaux présentés dans cette thèse (ARTICLE 2):

- Mise en évidence de l'existence d'un système glymphatique dans la moelle épinière
- Etude de la perfusion du système glymphatique dans l'encéphale et la moelle épinière de souris soumises à un modèle de SEP

RESULTATS

Etude 1 : Prédiction de l'activité de la maladie dans les modèles de sclérose en plaques avec l'imagerie par résonance magnétique moléculaire de la P-sélectine

Contexte de l'étude

L'IRM est aujourd'hui incontournable dans le diagnostic de la SEP. Cependant, les modalités actuelles permettent seulement la détection des processus inflammatoires tardifs, comme les plaques de démyélinisation et l'ouverture de la BHE. L'élaboration de nouvelles stratégies permettant la détection des évènements précoces pourrait s'avérer intéressante pour le diagnostic de la SEP.

Pour s'infiltrer dans le SNC, les cellules immunitaires interagissent avec des molécules d'adhésion vasculaires exprimées par les cellules endothéliales. Parmi ces molécules, la P-sélectine est connue pour être rapidement exprimée à la surface des cellules endothéliales dans les jours précédents l'apparition d'une poussée d'un modèle de SEP (Kerfoot and Kubes, 2002). En accord avec cela, l'IRM moléculaire de la P-sélectine développée par notre unité de recherche a prouvé son efficacité dans la détection de l'inflammation précoce (Quenault *et al.*, 2017).

Hypothèse

L'IRM moléculaire de la P-sélectine est-elle capable de détecter l'activité de la maladie et de prédire les poussées et rémissions d'un modèle murin de SEP ?

Méthodes

Des séquences IRM adaptées à l'imagerie de la moelle épinière chez l'animal en respiration libre ont été utilisées dans deux modèles murins de SEP. En parallèle, l'imagerie

optique *ex vivo* et l'immunohistochimie nous ont permis de mesurer la perméabilité de la BHE ainsi que l'infiltration leucocytaire.

Principaux résultats

- L'IRM moléculaire de la P-sélectine permet la mesure de l'activité de la maladie dans des modèles de SEP progressive et récurrente-rémittente.
- L'IRM moléculaire de la P-sélectine est capable de prédire la survenue d'une poussée chez les animaux asymptomatiques, et d'une récupération chez les animaux symptomatiques.

Article publié dans le journal *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS)*

Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin

Antoine Philippe Fournier[a], Aurélien Quenault[a], Sara Martinez de Lizarrondo[a], Maxime Gauberti[a], Gilles Defer[a,b], Denis Vivien[a,c], Fabian Docagne[a,1,2], and Richard Macrez[a,1]

[a]Normandie University, Unicaen, INSERM, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders, 14074 Caen, France; [b]CHU Caen, Department of Neurology, CHU Côte de Nacre, 14033 Caen, France; and [c]CHU Caen, Department of Clinical Research, CHU Côte de Nacre, 14033 Caen, France

Edited by Lawrence Steinman, Stanford University School of Medicine, Stanford, CA, and approved April 19, 2017 (received for review November 29, 2016)

New strategies for detecting disease activity in multiple sclerosis are being investigated to ameliorate diagnosis and follow-up of patients. Today, although magnetic resonance imaging (MRI) is widely used to diagnose and monitor multiple sclerosis, no imaging tools exist to predict the evolution of disease and the efficacy of therapeutic strategies. Here, we show that molecular MRI targeting the endothelial adhesion molecule P-selectin unmasks the pathological events that take place in the spinal cord of mice subjected to chronic or relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis. This approach provides a quantitative spatiotemporal follow-up of disease course in relation to clinical manifestations. Moreover, it predicts relapse in asymptomatic mice and remission in symptomatic animals. Future molecular MRI targeting P-selectin may be used to improve diagnosis, follow-up of treatment, and management of relapse/remission cycles in multiple sclerosis patients by providing information currently inaccessible through conventional MRI techniques.

MPIO | spinal cord | contrast agent | blood–brain barrier | USPIO

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory disease of the central nervous system (CNS) that leads to demyelination and diffuse neurodegeneration in the brain and spinal cord (1). The most frequent form (relapsing–remitting subtype) is characterized by unpredictable relapses followed by periods of months to years during which signs of disease activity are absent (2). The less frequent form (primary progressive subtype) is characterized by a constant progression of disability from the onset, with no, or only occasional and minor, remissions or improvements (2). Discovering biomarkers to predict disease evolution and/or therapeutic response in MS remains a major clinical challenge. Today, magnetic resonance imaging (MRI) is widely used to diagnose and monitor MS disease evolution (3), mostly by quantification of Gadolinium-chelate enhancing lesions, corresponding to active lesions with ruptured blood–brain barrier (BBB) or blood–spinal cord barrier (BSCB) (3). Although current MRI protocols allow quantifying lesion load, they remain poorly predictive of disease evolution and often fail to make early diagnosis of MS without follow-up imaging. This is an important limitation, because treatments could be started earlier if better diagnostic tools existed (4).

Leukocyte recruitment to CNS tissues plays a major role in MS. This process is mediated by adhesion molecules expressed on endothelial cells (5). We and others have described that antibodies against these endothelial adhesion molecules, coupled to microparticles of iron oxide (MPIOs), can monitor inflammation in animal models of brain diseases (6–8). Platelet-selectin (P-selectin), for example, can be targeted to monitor early vascular inflammation (9). P-selectin is rapidly expressed at the cell surface during endothelial activation in conditions of injury (10, 11), where it regulates myelin-specific T lymphocyte rolling on the endothelium (12, 13), a process important in the pathophysiology of MS models (13, 14). In fact, P-selectin has been detected in the brain and spinal cord of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) mice (15). P-selectin is therefore an ideal target for early detection of vascular inflammation in MS and its animal models. Here, we developed the framework allowing in vivo molecular MRI of endothelial activation and prediction of disease activity in two peptide-induced models of MS: chronic and relapsing–remitting experimental autoimmune encephalomyelitis [respectively, myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG)-induced EAE in C57BL/6 mice or proteolipidic protein (PLP)-induced EAE in SJL/J mice], mimicking the primary progressive and relapsing–remitting forms of MS, respectively.

Results

Characterization of MPIOs-αP-Selectin Binding to Activated BSCB Endothelium in EAE Mice. We first validated that P-selectin antibody binds the spinal cord endothelium of EAE, but not sham, animals (Fig. 1*A*) at the luminal surface (3D reconstruction, Fig. 1*A*) of small capillaries (preferentially postcapillary venules; Fig. S1). This antibody was then coupled to MPIOs to form MPIOs-αP-selectin, which bound the vascular endothelium after i.v. injection in EAE, but not in sham, animals (Fig. 1*B*). No signal void was observed in MRI (3D T2*-weighted imaging) without MPIO injection (Fig. 1*C*). In contrast, i.v injection of MPIOs-αP-selectin induced signal void within the whole spinal cord of PLP-induced EAE mice (Fig. 1*C*), whereas untargeted MPIOs (MPIOs-IgG) did not (Fig. 1*D*). Signal void was very similar when platelets were deleted (Fig. S2 *A–C*) than in nondepleted animals (Fig. S2*E*), indicating that MPIOs-αP-selectin–induced signal void is not influenced by P-selectin expression on platelets. Signal void was restricted to the white matter (Fig. 1 *C* and *E* and Fig. S3), the preferential localization of EAE lesions. The

Significance

Multiple sclerosis is a brain and spinal cord disease. In the most common forms, the disease unfolds by switching between periods of relapses, during which symptoms rise, and remissions, during which symptoms decline. However, it is not yet possible to predict the occurrence of relapses and remissions. Today, the diagnosis of multiple sclerosis is based on clinical criteria and on the use of magnetic resonance imaging (MRI). Here, we developed an MRI method that helps predict relapses and remissions in a classical model of multiple sclerosis in the mouse.

Author contributions: A.P.F., S.M.d.L., F.D., and R.M. designed research; A.P.F., A.Q., and S.M.d.L. performed research; A.P.F., S.M.d.L., F.D., and R.M. analyzed data; and A.P.F., S.M.d.L., M.G., G.D., D.V., F.D., and R.M. wrote the paper.

Conflict of interest statement: The use of P-selectin for the diagnosis of multiple sclerosis is the subject of a patent application (EP16305132.9) by F.D. for INSERM and University of Caen.

This article is a PNAS Direct Submission.

[1]F.D. and R.M. contributed equally to this work.

[2]To whom correspondence should be addressed. Email: docagne@cyceron.fr.

This article contains supporting information online at www.pnas.org/lookup/suppl/doi:10.1073/pnas.1619424114/-/DCSupplemental.

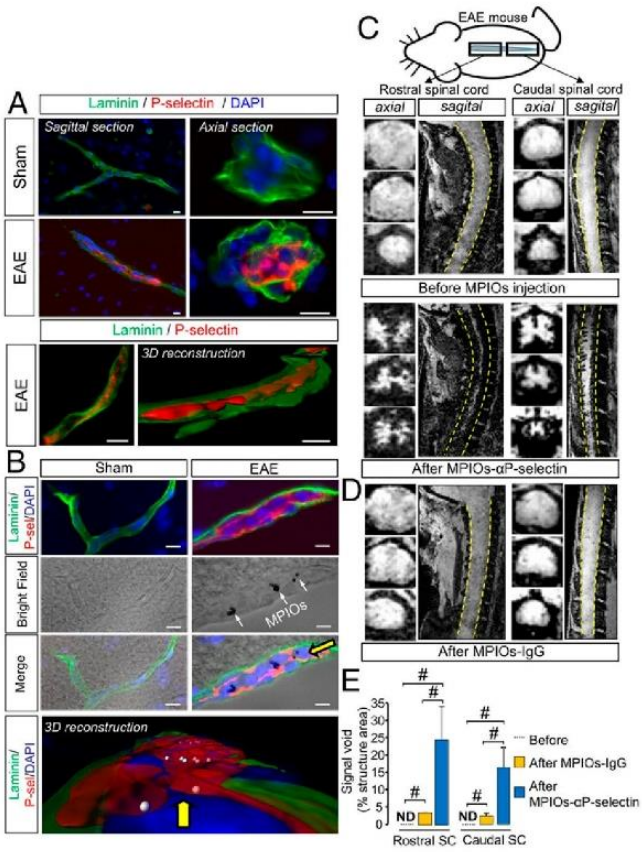


Fig. 1. MPIOs-αP-selectin–enhanced MRI reveals endothelial activation in the spinal cord during EAE. (*A* and *B*) Immunohistological images (*Upper*) and 3D reconstruction (*Lower*) (red, P-selectin; green, laminin; blue, DAPI) of sagittal and axial sections of spinal cord vessel from PLP-induced EAE mice (first relapse) and sham mice without (*A*) or with (*B*) i.v. injection of MPIOs-αP-selectin. (Scale bars: 10 μm.) White arrows, MPIOs-αP-selectin; yellow arrow, point of view compared with the above image. (*C* and *D*) Representative axial and sagittal T2*-weighted images of the rostral (*Left*) and caudal (*Right*) spinal cord (dashed line) of PLP-induced EAE mice before and after MPIOs-αP-selectin or MPIOs-IgG injection. (*E*) Corresponding quantification. ND, nondetected. $n = 3$–4 per group. $^{\#}P < 0.05$. See Table S1 for detailed sample size.

contrast agent was progressively cleared from the spinal cord in a time-dependent manner, resulting in minimal background contrast 24 h after MPIOs-αP-selectin injection (Fig. S4), which allows repetitive assessment of endothelial activation in the spinal cord with a minimal lapse of 24 h. Together, these results demonstrated the feasibility of sensitive and semiquantitative imaging of endothelial activation in the mouse spinal cord after i.v. injection of MPIOs-αP-selectin.

MPIOs-αP-Selectin Signal Increases with the Clinical Score in MOG-Induced EAE Mice. Then, we investigated whether MPIOs-αP-selectin could reveal the spatial and temporal dissemination of endothelial activation in chronic EAE mice (MOG-induced EAE; Fig. 2*A*). In sham animals, signal void was negligible (<5% of structure area) in rostral and caudal spinal cord (Fig. 2*D*). MOG-induced EAE animals showed a gradual caudo-rostral increase in MPIOs-αP-selectin–induced signal void correlated to increase in clinical score (Fig. 2*C* and corresponding quantification, Fig. 2 *D* and *E*). Signal void was detected both in the ventral and dorsal parts of the spinal cord and was restricted to the white matter (Fig. 2*C* and corresponding quantification, Fig. 2 *F* and *G*).

Because P-selectin is involved in T lymphocyte infiltration toward inflamed tissues, we assessed whether this infiltration matched the distribution of MPIOs-αP-selectin–induced signal. In fact, the infiltration of T_4 lymphocytes (CD_4^+ cells) followed a caudo-rostral progression over time in relation to clinical score (CS1–CS4), equivalent to what we observed for MPIOs-αP-selectin (Fig. 3*A* and corresponding quantification, Fig. 3*B*). No infiltration was observed in sham mice (Fig. 3 *A* and *B*), whatever the spinal cord segment. Similar observations were made concerning $CD3^+$ cells (Fig. S5 *A* and *B*). Matching MPIOs-αP-selectin signal, T_4 lymphocytes infiltration was specific of the white matter (Fig. 3*C* and corresponding quantification; Fig. 3*D*). This infiltration occurred at sites of increased BSCB permeability, as shown by colocalization with fibrinogen (Fig. 3*A* and Fig. S5*A*). Increase in BSCB permeability followed a caudo-rostral progression over time in relation to clinical score (Fig. 3 *E* and *F* and corresponding quantification, Fig. 3*G*), which paralleled T_4 lymphocyte infiltration (Fig. 3*A*) and P-selectin signal observed in MRI (Fig. 2).

MPIOs-αP-Selectin Signal Follows Disease Activity in PLP-Induced EAE Mice. Our next step was to assess whether of MPIOs-αP-selectin can reveal the spatial and temporal dissemination of endothelial activation in a disease with a relapsing–remitting course (PLP-induced

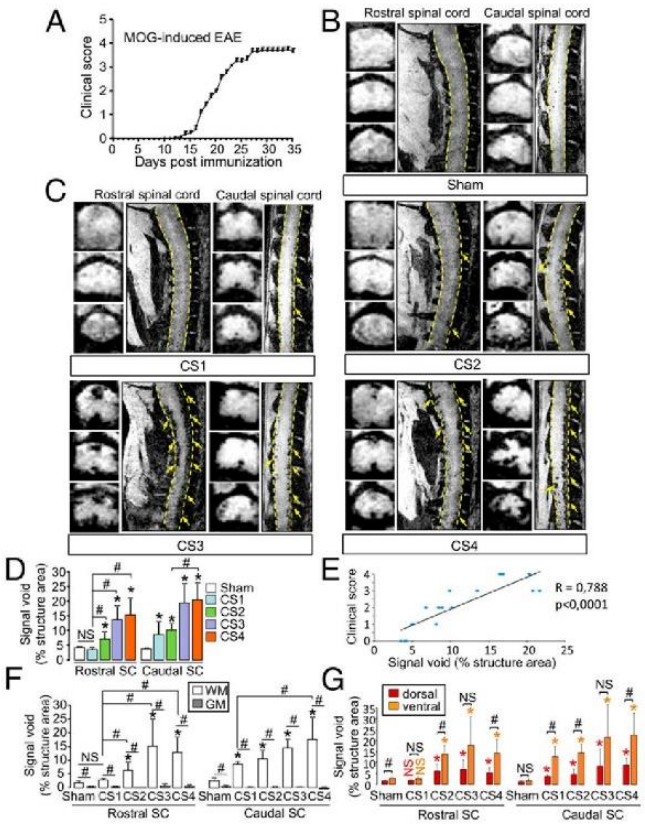


Fig. 2. Spatiotemporal distribution of MPIOs-αP-selectin–induced hypo-signal follows the clinical worsening in chronic EAE mice (MOG-induced EAE). (*A*) Clinical score (CS) evolution in MOG-induced EAE. (*B* and *C*) Representative axial and sagittal T2*-weighted images of rostral and caudal spinal cord (dashed line) after MPIOs-αP-selectin injection did not reveal induced signal void in sham (*B*) or EAE (*C*) mice. Yellow arrows, signal void. (*D*) Corresponding quantification. NS, not significant; $^{*}P < 0.05$ vs. the same structure in sham animals; $^{\#}P < 0.05$. (*E*) Correlation between signal void and clinical score. (*F* and *G*) Quantification of the signal void distribution between white matter (WM; white bar) and gray matter (GM; gray bar) (*F*) and between dorsal (red bar) and ventral (orange bar) spinal cord (*G*) (quantified from coronal images). NS, not significant; $^{*}P < 0.05$ vs. sham in the same structure; $^{\#}P < 0.05$ vs. indicated condition. See Table S1 for detailed sample size.

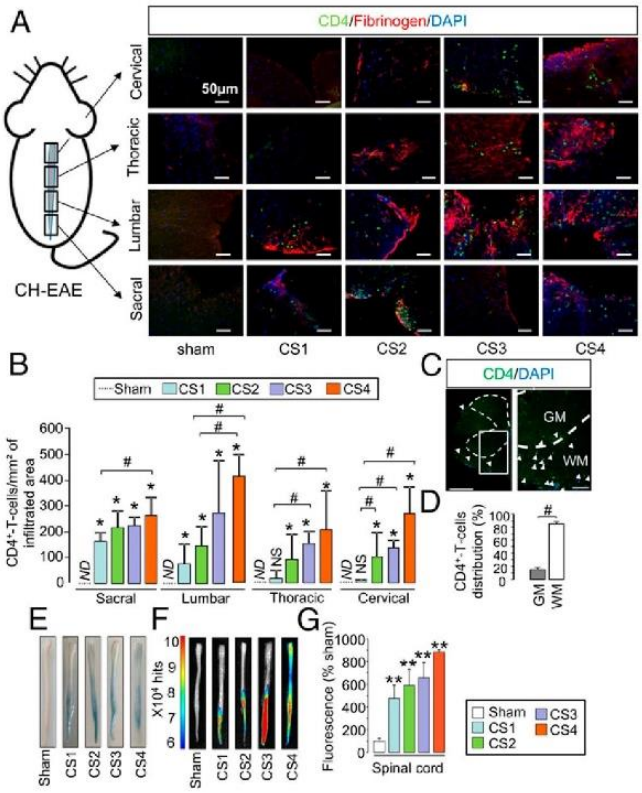


Fig. 3. Spatiotemporal dissemination of the immune cell infiltration and BSCB opening follow the pattern of P-selectin vascular activation in the spinal cord of MOG-induced EAE mice. (*A*) Immunohistological images of the infiltrated areas of the MOG-induced EAE spinal cord. $CD4^+$ leukocyte (green), fibrinogen (red), and cell nuclei (blue) show the spatiotemporal dissemination of immune cell infiltration. Each line of images corresponds to a spinal cord section (in order from top to bottom: cervical, thoracic, lumbar, and sacral). Each column corresponds to a clinical score (CS; CS1 to CS4). (Scale bars: 50 µm.) (*B*) Corresponding quantification. ND, nondetected; $^*P < 0.05$ vs. the same structure in sham animals; $^{\#}P < 0.05$ vs. indicated condition. $n = 3$ mice for each clinical group. (*C*) Immunohistological image of whole section of MOG-induced EAE spinal cord (peak of the disease) with a low (*Left*) and a high (*Right*) magnification. [Scale bars: 500 µm (*Left*) and 100 µm (*Right*).] GM, gray matter; WM, white matter. (*D*) Whole spinal cord quantification of the distribution of the $CD4^+$ T-cell infiltration between white matter (white bar) and gray matter (gray bar). $^{\#}P < 0.05$. (*E*) Spinal cord photographs after i.v. Evans blue dye injection in MOG-induced EAE. (*F*) Ex vivo optical imaging of Evans blue fluorescence. (*G*) Quantification of fluorescence in spinal cord tissues. $^{**}P < 0.01$ vs. the same structure in sham animals. See Table S1 for detailed sample size.

EAE; Fig. 4*A*). In sham animals, signal void was negligible (<5% of structure area) in caudal and rostral spinal cord (Fig. 4*B* and corresponding quantification, Fig. 4*D*). MPIOs-αP-selectin signals in the caudal and rostral spinal cord revealed endothelial activation in phases of active disease (first and second relapse; Fig. 4*C*). Accordingly, this signal was lower during phases of disease recovery (Fig. 4*C*). Corresponding quantification confirmed these MRI observations (Fig. 4*D*): Signal void increased during the first relapse in the caudal spinal cord (23.90% vs. 3.12% for sham mice at the same time, $P < 0.05$; Fig. 4*D*) and in the rostral cord (18.03% vs. 2.01% for sham mice at the same time, $P < 0.05$; Fig. 4*D*). During recovery, signal void decreased compared with the first relapse in the caudal spinal cord (8.11%; $P < 0.01$; Fig. 4*D*) and in the rostral spinal cord (3.99%; $P < 0.01$; Fig. 4*D*). Interestingly, signal void was higher in remitting animals (recovery) than in sham mice (3.12% vs. 8.11% and 2.01% vs. 3.99%; $P < 0.05$; Fig. 4*D*). This result was observed either when MRI sessions were performed after single injections in different animals (Fig. 4 *C* and *D*) or when the same animals were injected and scanned twice (Fig. S4 *E–G*), which shows that the remaining signal was not from previous injections. During the second relapse stage, signal void increased again compared with recovery (29.61% vs. 8.11% for caudal spinal cord and 30.29% vs. 3.99% for rostral spinal cord; $P < 0.01$; Fig. 4*D*) to reach levels comparable to what observed during the first relapse. Overall, MPIOs-αP-selectin–induced signal void in the spinal cord was positively correlated to clinical score (Fig. 4*E*). As observed for MOG-induced EAE (Fig. 2), signal void was detected in the dorsal and ventral parts of the spinal cord and restricted to white matter (Fig. 4*C* and corresponding quantification, Fig. 4 *F* and *G*).

We then assessed whether, as observed above in MOG-induced EAE (Fig. 3), T_4 lymphocyte infiltration matched the distribution of MPIOs-αP-selectin–induced signal (Fig. 5*A*). The simple quantification of the number of lymphocytes within affected tissues did not give a direct indication of disease activity. Although T_4 lymphocyte infiltration was maximum in all spinal cord segments (sacral, lumbar, thoracic, and cervical) during the

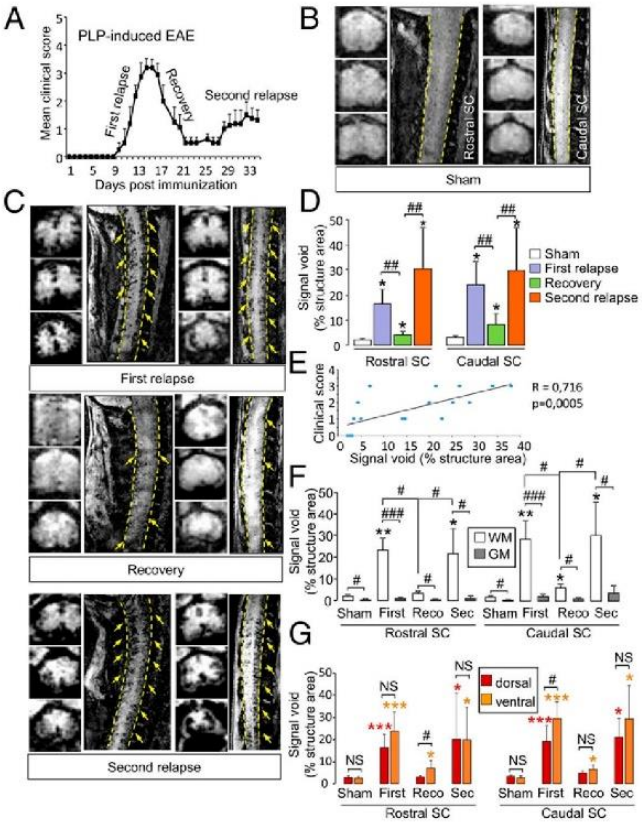


Fig. 4. Spatiotemporal distribution of MPIOs-αP-selectin–induced hypo-signal follows the clinical worsening in relapsing–remitting EAE mice (PLP-induced EAE). (*A*) Clinical score evolution in PLP-induced EAE. (*B* and *C*) Representative axial and sagittal T2*-weighted images of rostral and caudal spinal cord (dashed line) after MPIOs-αP-selectin injection in sham (*B*) or EAE (*C*) mice. Yellow arrows, signal void. (*D*) Corresponding signal void quantification of MPIOs-αP-selectin–induced signal voids in the spinal cord (quantified from sagittal images). $^*P < 0.05$ vs. sham animals in the same structure; $^{\#}P < 0.05$; $^{\#\#}P < 0.01$ vs. indicated condition. (*E*) Correlation analysis between void and clinical score. (*F* and *G*) Quantification of the signal void distribution between white matter (WM; white bar) and gray matter (GM; gray bar) (*F*) and between dorsal (red bar) and ventral (orange bar) spinal cord (*G*) (quantified from coronal images). $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$ vs. sham animals in the same structure; $^{\#}P < 0.05$; $^{\#\#}P < 0.01$; $^{\#\#\#}P < 0.001$ vs. indicated condition. See Table S1 for detailed sample size.

NEUROSCIENCE

first relapse (Fig. 5*B*), the number of T_4 lymphocytes was not substantially altered during recovery (Fig. 5*B*), despite a tendency to decrease. In line with this finding, the number of T_4 lymphocytes also remained stable during the second relapse (Fig. 5*B*). As already shown above in the MOG-induced EAE model (Fig. 3*A*), lymphocyte infiltration occurred at sites of increased blood–spinal cord permeability (as shown by colocalization with fibrinogen, Fig. 5*A* and Fig. S5 *C* and *D*). Nevertheless, changes in BSCB permeability did not fully match disease activity (Fig. 5 *E* and *F* and corresponding quantification, Fig. 5*G*): Permeability increased in all spinal cord segments during the first relapse, decreased during recovery but remained above sham levels during the remission period, and did not increase substantially during the second relapse.

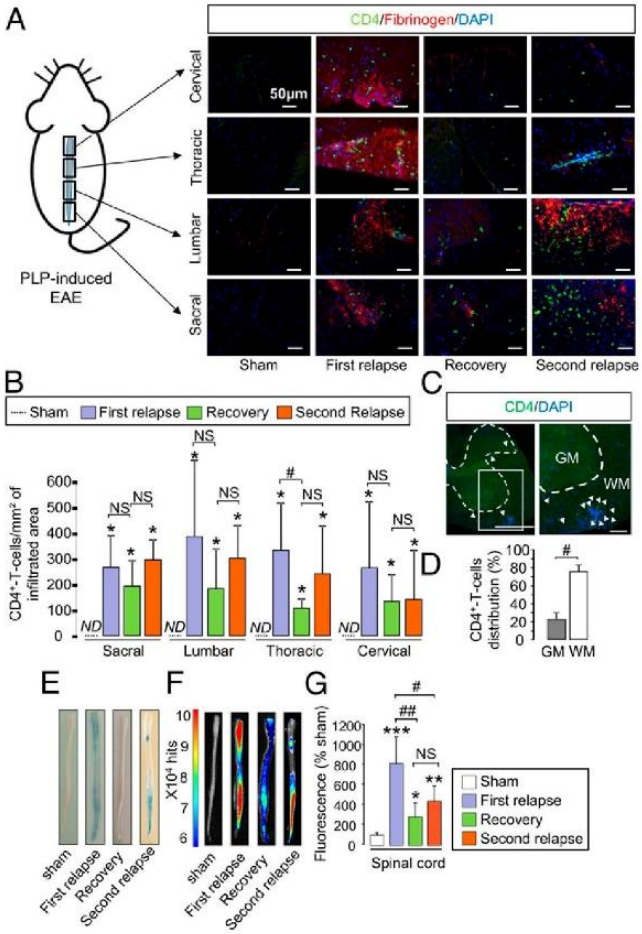


Fig. 5. Spatiotemporal dissemination of the immune cell infiltration and BSCB opening do not follow the pattern of P-selectin vascular activation in the spinal cord of PLP-induced EAE mice. (*A*) Immunohistological images of the infiltrated areas of the PLP-induced EAE spinal cord. $CD4^+$ leukocyte (green), fibrinogen (red), and cell nuclei (blue) show the spatiotemporal dissemination of the immune cell infiltration. Each line of images corresponds to a spinal cord section (in order from top to bottom: cervical, thoracic, lumbar, and sacral). Each column corresponds to a different stage of the disease (sham, first relapse, recovery, and second relapse; $n = 3$ per group). (*B*) Corresponding quantification. ND, nondetected; NS, not significant; $^*P < 0.05$ vs. sham animals in the same structure; $^{\#}P < 0.05$ vs. indicated condition ($n = 3$ mice for each clinical group). (*C*) Immunohistological image of whole section of PLP-induced EAE spinal cord (peak of the first relapse) with a low magnification (*Left*) and a high magnification (*Right*). [Scale bars: 500 µm (*Left*) and 100 µm (*Right*).] GM, gray matter; WM, white matter. (*D*) Quantification of the distribution of the $CD4^+$ T-cell infiltration between the white matter (white bar) and in the gray matter (gray bar). $^{\#}P < 0.05$. (*E*) Spinal cord photographs after i.v. Evans blue dye injection in PLP-induced EAE. (*F*) Ex vivo optical imaging of Evans blue fluorescence. (*G*) Quantification of fluorescence in spinal cord tissues. $^*P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$; $^{***}P < 0.001$ vs. the same structure in sham animals; $^{\#}P < 0.05$, $^{\#\#}P < 0.01$ vs. indicated condition. See Table S1 for detailed sample size.

In the same manner as described above for MOG-induced EAE, in PLP-induced EAE, the distribution of T_4 lymphocytes between spinal gray and white matter matched that of MPIOs-α P-selectin: T_4 lymphocyte infiltration occurred preferentially in the white matter compared with the gray matter (Fig. 5*C* and corresponding quantification, Fig. 5*D*).

MRI using MPIOs-αP-selectin was also performed in the brain and cerebellum (Fig. S6). In MOG-induced EAE, no change in signal void was observed in the brain or cerebellum at any of the clinical stages compared with sham animals (Fig. S6*A* and corresponding quantification, Fig. S6*B*), which was consistent with the absence of lymphocyte infiltration (Fig. S6*C*). In contrast, in PLP-induced EAE, MRI using MPIOs-αP-selectin showed a profile comparable to the spinal cord (Fig. S6 *D–F*), preferentially in the white matter (Fig. 6 *G* and *H*). Overall, these results support the use of MPIOs-αP-selectin–enhanced MRI to detect the severity and the spatiotemporal dissemination of endothelial activation in EAE.

MPIOs-α P-Selectin Allows for Predicting Relapses in Asymptomatic Animals and Remissions in Symptomatic Animals. We first assessed the ability of MPIOs-αP-selectin to predict the appearance of a first relapse in asymptomatic animals (Fig. 6). Asymptomatic animals (clinical score 0) were injected i.v. with MPIOs-αP-selectin at day 10 (median day of first relapse) and subjected to molecular imaging (Fig. 6 *A* and *B*). We stratified two groups of mice based on their endothelial activation profile at day 10 (Fig. 6 *B* and *C*) and monitored them clinically for the occurrence or not of a second relapse at day 11 (Fig. 6*A*). A first group (P-selectin-low) showed little, if any, signal void in MRI (individual signal void <5%, mean signal void: 3.69 ± 1.12%; Fig. 6 *B* and *C*) and a second group (P-selectin-high) showed substantial MPIOs-αP-selectin signal void in MRI (individual signal void > 5%, mean signal void: 17.77 ± −4.5%; Fig. 6 *B* and *C*). Interestingly, none of the EAE animals within the P-selectin–low group showed a second relapse 24 h later (day 11) (Fig. 6*D*: mean clinical score 0. Fig. 6*E*: 0 animals with deficit at day 11). Conversely, all P-selectin-high animals declared a first relapse 24h later (day 11) (Fig. 6*D*: mean clinical score 2.4 ± 0.48. Fig. 6*E*: 100% of animals showing deficits at day 11). P-selectin-low animals did not show overt demyelination (Fig. 6*F*, *Left*), whereas P-selectin-high animals did (punctuate or absent MBP immunostaining Fig. 6*F*, *Right*). Axonal damage was, however, present in P-selectin-high and P-selectin-low animals (SMI-32 staining; Fig. 6*G*).

Second, we assessed whether MPIOs-αP-selectin imaging could predict remission in symptomatic animals (Fig. S7). Symptomatic animals were injected with MPIOs-αP-selectin at disease peak (day 15) and subjected to molecular imaging (Fig. S7 *A* and *B*). Following the same strategy as above, we stratified two groups of mice (P-selectin-low and P-selectin-high) based on their MRI profile at day 15 (Fig. S7 *B* and *C*) and monitored them clinically for the occurrence or not of a remission at day 16 (Fig. S7*A*). Interestingly, none of the EAE animals within the P-selectin-high group showed remission 24 h later (day 16) (Fig. S7*D*: mean clinical score 2.5 ± 0.57. Fig. S7*E*: 0 animals in recovery at day 16). Conversely, all P-selectin-low animals recovered 24 h later (day 6) (Fig. S7*D*: mean clinical score 0.5 ± 0.58. Fig. S7*E*: 100% of animals in remission at day 15). Overall, these data indicate that MPIOs-αP-selectin enhanced molecular MRI allows predicting relapses and remissions in PLP-induced EAE.

Discussion

This study reports the development of an original molecular-imaging method for the detection of neuroinflammation in the mouse CNS. By targeting P-selectin, and by using MRI sequences

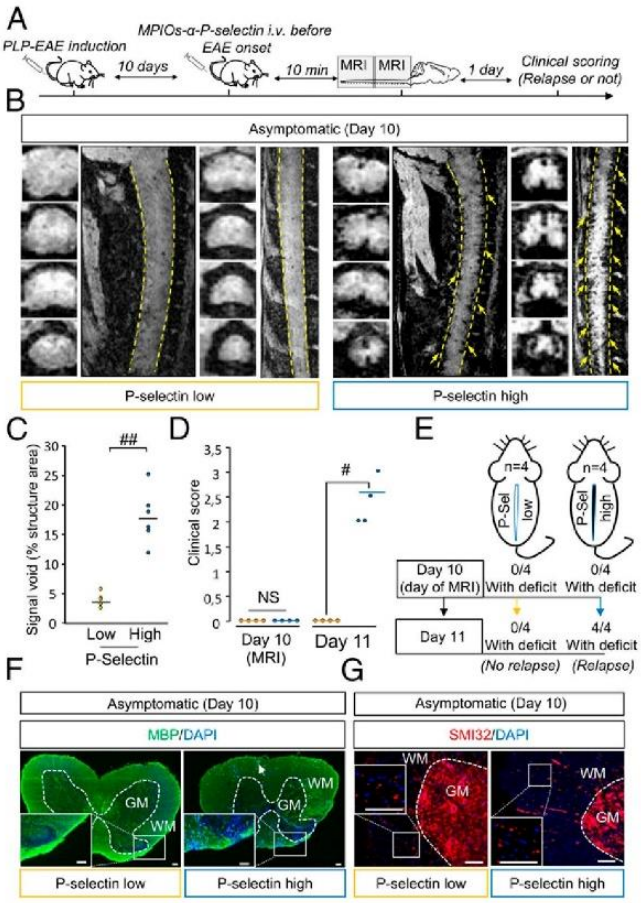


Fig. 6. MPIOs-αP-selectin–induced hyposignal predicts relapses in PLP-induced EAE. (*A*) Experimental design. (*B*) Representative high-resolution T2*-weighted images after MPIOs-α P-selectin injection PLP-induced EAE mice without deficits (CS 0 at day 10; D10). Yellow arrows indicate signal voids. (*C*) Corresponding signal void quantification. $^{##}P < 0.01$. (*D*) Clinical score of P-selectin-high (blue line) or -low (yellow line) mice the day of MRI acquisition (D10) and the day after (D11). $^{\#}P < 0.05$. (*E*) Schematic representation of the main findings. (*F*) Representative immunohistological images of myelin basic protein (MBP; green) and cell nuclei (blue) in asymptomatic P-selectin-low and -high animals. (*G*) Representative immunohistological images of axonal damage (SMI-32; red) and cell nuclei (blue) in asymptomatic P-selectin-low and asymptomatic P-selectin-high animals. (Scale bars: 100 μm.) See Table S1 for detailed sample size.

adapted to the imaging of the spinal cord, we provide a diagnostic follow-up for animals subjected to chronic or relapsing–remitting EAE. This study shows the validity of molecular imaging targeting P-selectin for the explorative follow-up of MS-like disease and the prognosis of relapse and remission in mice subjected to animal models of MS.

Imaging-based diagnosis in MS currently consists of tracking the spatiotemporal dissemination of lesions. In this instance, T_2-weighted and Fluid Attenuation Inversion Recovery sequences were used for the observation of plaques, and Gadolinium-enhanced T_1-weighted sequences were used for the detection of the BBB/BSCB opening and to estimate whether a lesion is new or old. Therefore, endothelial activation and subsequent leukocyte infiltration are not currently assessed by imaging in the clinical practice. Because blood–brain/blood–spinal cord opening, and inflammatory cell infiltration are not necessarily associated (16, 17), MS diagnosis would gain from reliable information concerning endothelial activation provided by MPIOs-αP-selectin–enhanced molecular MRI to improve the estimation of disease activity and enable the earlier detection of lesions in formation.

MRI using MPIOs coupled to antibodies against endothelial adhesion molecules have been used before to assess endothelial activation in experimental models of brain diseases with a neuroinflammatory component (11). MPIO-coupled antibodies against inducible cell adhesion molecule 1 (ICAM-1) and vascular cell adhesion molecule 1 (VCAM-1) were used in animal models of stroke, Alzheimer's disease (8), and MS (7, 18, 19). More recently, an equivalent strategy targeting P-selectin has been developed in our group (9). This tool showed optimized sensitivity, compared with VCAM-1–targeted MPIOs, for the detection of endothelial activation, especially in the context of mild insults such as transient ischemic attack (9). In the present study, we show that this tool enables follow-up of disease activity and prediction of relapse/remission cycles in EAE. In a previous study, MRI-compatible agents (glyconanoparticles) indiscriminately targeting E- and P-selectin were used to detect focal inflammation in the brain of EAE mice (20). E-selectin expression has been suggested to occur subsequently to P-selectin (21). Because the question of the timing was crucial in the present study, we believe that targeting P-selectin provided an advantage over E-selectin. The present work brings the following elements: (*i*) detection of endothelial activation not only in the brain, but also in the cerebellum and spinal cord; (*ii*) quantitative spatiotemporal follow-up of disease course in relation to clinical manifestations; (*iii*) follow-up in two different models of EAE for which specificities were unveiled by P-selectin imaging; (*iv*) spatial resolution and sensitivity high enough to allow imaging inflammation in the spinal cord of EAE mice, with a distinction between white and gray matter; and (*v*) prediction of relapses and remissions. Of note, CNS endothelial cells—in contrast to any other endothelial cells in the body—do not store P-selectin in Weibel–Palade bodies, but rather up-regulate P-selectin expression in inflammatory conditions (10). This fact may explain the very low MPIOs-αP-selectin–induced signal in control conditions, which may have contributed to increase the sensitivity of our method.

Although the chronic model showed a slow caudo-rostral progression of endothelial activation only in the spinal cord (ventral part), the relapsing–remitting model showed endothelial activation in the whole spinal cord (ventral and dorsal part), the brain, and the cerebellum from the early stages. Rather than a direct reflection of the number of lymphocytes within the tissue, P-selectin imaging gives a reliable and quantitative reflection of disease activity. This finding is very important when considering that lymphocyte number in the tissue is not a direct index of disease activity. In fact, we report differential patterns of lymphocyte infiltration in the two models: In MOG-induced EAE, the constant progression of symptoms along time was associated with a constant increase in both the number of lymphocytes and BSCB permeability. In contrast, in PLP-induced EAE, the number of lymphocytes remained mostly unchanged during relapses and remission, despite variations of BSCB permeability. In particular, remission was not accompanied by a drop in the number of lymphocytes within the tissue, except for thoracic regions, although BSCB permeability partially recovered. In contrast, relapse was not accompanied by either an increase in lymphocyte number or an increase in BSCB permeability. This finding is compatible with the fact that remission is not necessarily linked to a decrease in infiltrate number (due to their degeneration or "exit" from the spinal cord). Conversely, relapse is not necessarily linked to an increase in infiltrate number. Rather, relapse and remission could be due to changes in phenotype or activity of infiltrated cells (22). Also, one has to consider that only T cells that have crossed the *glia limitans* mediate the disease (23, 24), which may explain why the global number of lymphocytes does not reliably reflect disease activity. P-selectin

NEUROSCIENCE

signal, in contrast, is proportional to disease activity: It raises during relapses and drops during remission.

Because we used male mice for MOG-EAE and female mice for PLP-EAE, differences between the two models might in part be due to sex differences. Further studies should be performed in appropriate animal models.to address this question.

P-selectin signal is not only an index of disease activity, but also predicts relapse and remission in PLP-induced EAE. The presence of MPIOs-αP-selectin–induced signal void in asymptomatic animals predicts the appearance of relapse. Conversely, the disappearance of P-selectin signal in symptomatic animals predicts their remission. This finding suggests that imaging tools targeting P-selectin may serve in the managing of MS patients. In particular, detection of an increased P-selectin signal may help documenting the ongoing formation of a new lesion before it can be observed by using conventional imaging. In line with this finding, increased P-selectin signal may predict relapses in remitting patients, which would enable anticipating the setup of treatment. Conversely, the decrease in P-selectin signal may announce remission in patients with active disease. This method may be particularly useful to assess the ability of a drug to modify disease course in primary progressive or relapsing–remitting MS. Future imaging tools targeting P-selectin may thus be used as "companion diagnosis" for clinical practice or in clinical trials.

"P-selectin-low" animals show axonal damage without overt demyelination (normal appearing white matter; NAWM), whereas in "P-selectin-high" animals, the combination of demyelination and axonal damage could induce symptom onset. Previous reports suggested that axonal damage can occur independently and not necessarily as a consequence of demyelination (25, 26). Our method could discriminate between animals in which NAWM predominates and those in which demyelination and axonal damage concur.

The size of MPIOs avoids their passive extravasation across BBB and BSCB, which supports the use of MPIO-coupled antibodies to specifically detect endothelial activation. However, one limitation to their use as imaging tools in humans is their poor biodegradability. The half-life of MPIOs in the bloodstream is short (27), but they remain in peripheral organs after their injection (28) (Fig. S8*A*), although they do not interfere with EAE course (Fig. S8*B*). Nevertheless, this limitation should be overcome soon by the synthesis of new-generation, biodegradable contrast-enhancing particles (29, 30), some of them being compatible with the detection of inflammation in vivo (31). The dose of iron injected into the animals (1 mg/kg) has also been reduced in our study compared with previous studies (11), thanks to the strong signal changes induced by MPIOs-αP-selectin. In addition, MPIOs-αP-selectin is cleared from target endothelium in less than 24 h, which makes them compatible with repeated measures and longitudinal follow-up. Together, these points indicate that, in the future, biodegradable contrast-enhancing particles targeting P-selectin may be developed for diagnosis, follow-up, and prediction of relapse and remission in MS.

Materials and Methods

Animal experiments were performed in accordance with the French (Decree 87/848) and the European (Directive 86/609) guidelines (Project 02654.02, Center Agreement D14118001). Standard procedures for experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), MPIO conjugation, MRI, vascular permeability, immunohistochemistry and statistical analysis are described in *SI Materials and Methods*.

ACKNOWLEDGMENTS. We thank Dr. Rubio Marina and Prof. Ali Carine for their useful advices concerning the manuscript; Dr. Camille Leonetti for her help with 3D image reconstructions; and Dr. Mikaël Naveau for his guidance on statistics. This work was supported by the European Union via the FP7 programme, INSERM, Unicaen, Regional Council of Normandy, and the Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques.

1. Compston A, Coles A (2008) Multiple sclerosis. *Lancet* 372:1502–1517.
2. Lublin FD (2014) New multiple sclerosis phenotypic classification. *Eur Neurol* 72:1–5.
3. Polman CH, et al. (2011) Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 revisions to the McDonald criteria. *Ann Neurol* 69:292–302.
4. Frohman EM, et al. (2006) Most patients with multiple sclerosis or a clinically isolated demyelinating syndrome should be treated at the time of diagnosis. *Arch Neurol* 63: 614–619.
5. Rossi B, Angiari S, Zenaro E, Budui SL, Constantin G (2011) Vascular inflammation in central nervous system diseases: Adhesion receptors controlling leukocyte-endothelial interactions. *J Leukoc Biol* 89:539–556.
6. McAteer MA, et al. (2007) In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide. *Nat Med* 13:1253–1258.
7. Serres S, et al. (2011) VCAM-1-targeted magnetic resonance imaging reveals subclinical disease in a mouse model of multiple sclerosis. *FASEB J* 25:4415–4422.
8. Montagne A, et al. (2012) Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders. *Neuroimage* 63:760–770.
9. Quenault A, et al. (2017) Molecular magnetic resonance imaging discloses endothelial activation after transient ischaemic attack. *Brain* 140:146–157.
10. Barkalow FJ, Goodman MJ, Gerritsen ME, Mayadas TN (1996) Brain endothelium lack one of two pathways of P-selectin-mediated neutrophil adhesion. *Blood* 88:4585–4593.
11. Gauberti M, Montagne A, Quenault A, Vivien D (2014) Molecular magnetic resonance imaging of brain-immune interactions. *Front Cell Neurosci* 8:389.
12. Carrithers MD, Visintin I, Kang SJ, Janeway CA, Jr (2000) Differential adhesion molecule requirements for immune surveillance and inflammatory recruitment. *Brain* 123:1092–1101.
13. Sathiyanadan K, Coisne C, Enzmann G, Deutsch U, Engelhardt B (2014) PSGL-1 and E/P-selectins are essential for T-cell rolling in inflamed CNS microvessels but dispensable for initiation of EAE. *Eur J Immunol* 44:2287–2294.
14. Piccio L, et al. (2005) Efficient recruitment of lymphocytes in inflamed brain venules requires expression of cutaneous lymphocyte antigen and fucosyltransferase-VII. *J Immunol* 174:5805–5813.
15. Kerfoot SM, Kubes P (2002) Overlapping roles of P-selectin and alpha 4 integrin to recruit leukocytes to the central nervous system in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Immunol* 169:1000–1006.
16. Ladewig G, et al. (2009) Spatial diversity of blood-brain barrier alteration and macrophage invasion in experimental autoimmune encephalomyelitis: A comparative MRI study. *Exp Neurol* 220:207–211.
17. Weise G, Stoll G (2012) Magnetic resonance imaging of blood brain/nerve barrier dysfunction and leukocyte infiltration: Closely related or discordant? *Front Neurol* 3:178.
18. Mardiguian S, et al. (2013) Anti-IL-17A treatment reduces clinical score and VCAM-1 expression detected by in vivo magnetic resonance imaging in chronic relapsing EAE ABH mice. *Am J Pathol* 182:2071–2081.
19. Blezer ELA, et al. (2015) In vivo MR imaging of intercellular adhesion molecule-1 expression in an animal model of multiple sclerosis. *Contrast Media Mol Imaging* 10: 111–121.
20. van Kasteren SI, et al. (2009) Glyconanoparticles allow pre-symptomatic in vivo imaging of brain disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 106:18–23.
21. Yang J, et al. (1999) Targeted gene disruption demonstrates that P-selectin glycoprotein ligand 1 (PSGL-1) is required for P-selectin-mediated but not E-selectin-mediated neutrophil rolling and migration. *J Exp Med* 190:1769–1782.
22. Koutrolos M, Berer K, Kawakami N, Wekerle H, Krishnamoorthy G (2014) Treg cells mediate recovery from EAE by controlling effector T cell proliferation and motility in the CNS. *Acta Neuropathol Commun* 2:163.
23. Flach A-C, et al. (2016) Autoantibody-boosted T-cell reactivation in the target organ triggers manifestation of autoimmune CNS disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 113: 3323–3328.
24. Agrawal S, et al. (2006) Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J Exp Med* 203:1007–1019.
25. Recks MS, et al. (2013) Early axonal damage and progressive myelin pathology define the kinetics of CNS histopathology in a mouse model of multiple sclerosis. *Clin Immunol* 149:32–45.
26. Lassmann H (2010) Axonal and neuronal pathology in multiple sclerosis: What have we learnt from animal models. *Exp Neurol* 225:2–8.
27. Melemenidis S, et al. (2015) Molecular magnetic resonance imaging of angiogenesis in vivo using polyvalent cyclic RGD-iron oxide microparticle conjugates. *Theranostics* 5:515–529.
28. Belliere J, et al. (2015) Unmasking silent endothelial activation in the cardiovascular system using molecular magnetic resonance imaging. *Theranostics* 5:1187–1202.
29. Sakhalkar HS, et al. (2003) Leukocyte-inspired biodegradable particles that selectively and avidly adhere to inflamed endothelium in vitro and in vivo. *Proc Natl Acad Sci USA* 100:15895–15900.
30. Nkansah MK, Thakral D, Shapiro EM (2011) Magnetic poly(lactide-co-glycolide) and cellulose particles for MRI-based cell tracking. *Magn Reson Med* 65:1776–1785.
31. Perez-Balderas F, et al. (2017) Covalent assembly of nanoparticles as a peptidase-degradable platform for molecular MRI. *Nat Commun* 8:14254.

Supporting Information

Fournier et al. 10.1073/pnas.1619424114

SI Materials and Methods

EAE. Chronic EAE (MOG-induced EAE) was induced in 12-wk-old male C57BL6/J mice (Janvier) via s.c. immunization with 200 μg of recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein (MOG_{35-55}, Cambridge Research Biochemicals) in an emulsion mixed (volume ratio 1:1) with Complete Freund's Adjuvant (CFA; Difco Laboratories) containing 600 μg of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (MBT; Difco). Control (CFA) animals were injected with saline mixed with CFA containing 500 μg of heat-killed MBT. The emulsion was administered to regions above the shoulder and the flanks (total of four sites; 50 μL at each injection site). All animals were additionally intraperitoneally (i.p.) injected with 200 ng of pertussis toxin derived from *Bordetella* pertussis (Sigma-Aldrich) in 200 μL of saline at the time of and at 48 h after immunization.

Relapsing–remitting EAE (PLP-induced EAE) was induced in 5- to 7-wk-old female SJL/J mice (Janvier) via the same protocol [except that MOG is replaced by recombinant proteolipidic protein ($PLP_{139-151}$; Eurogentec)].

All animals of this study were maintained under specific pathogen-free conditions at the Centre Universitaire de Ressources Biologiques (Basse-Normandie, France).

Clinical Score. Mice were examined daily for clinical signs of EAE and were scored as follows: 0, no disease; 1, limp tail; 2, hindlimb weakness; 3, complete hindlimb paralysis; 4, hindlimb paralysis plus forelimb paralysis; and 5, moribund or dead. Induction of EAE was performed by two persons blinded without knowledge of the injected treatment (saline or myelin protein). All clinical scores were assessed daily by one examiner blinded to the EAE.

Targeting Moiety Conjugation to MPIO. Purified polyclonal goat anti-mouse antibodies for P-selectin (AF737; R&D Systems) or control rat IgG (Jackson ImmunoResearch) were covalently conjugated to MPIO (diameter 1.08 μm) with *p*-toluenesulphonyl reactive surface groups (Invitrogen) in borate buffer (pH 9.5) by incubation at 37 °C for 48 h. A total of 40 μg of antibody was used for the coating of 1 mg of reactive MPIOs. MPIOs were then washed in PBS containing 0.5% BSA at 4 °C and incubated for 24 h at room temperature, to block the remaining active groups. MPIOs were rinsed in PBS (0.1% BSA). To disperse MPIO aggregates, a sonication procedure at low intensity was performed immediately after antibody labeling for 60 s. Thereafter, conjugated MPIOs were stored at 4 °C in a PBS buffer under constant agitation to prevent settling and aggregate formation.

MRI and Analysis. The 3D respiration-gated T2*-weighted gradient echo imaging with flow compensation (GEFC; spatial resolution of 150 μm × 75 μm × 75 μm interpolated to an isotropic resolution of 75 μm) with TE/TR 8.6/200 ms and a flip angle (FA) of 25° was performed to visualize MPIOs (acquisition time = 10 min). All high-resolution T2*-weighted images presented in this study are minimum-intensity projections of four consecutive slices (yielding a Z resolution of 280 μm). When appropriate, mice randomly received MPIO-IgG or MPIO-p-selectin. Although MPIO injections were performed outside the magnet, the positions of the mice during pre- and post-MPIO acquisitions did not change (the mice were placed exactly at the same position and were not removed from the animal holder). MRIs were not performed in the same animals longitudinally.

Prediction of Relapses and Remissions by MRI. For prediction of the first relapse, PLP-EAE mice were imaged with MPIO-α-P-Sel at day 10 after induction, when ~50% of mice were expected to experience symptom onset, based on a retrospective study of incidence in which we pooled several previous studies in our laboratory ($n = 110$). The number of mice was not adjusted, nor were any mice excluded or added. The mice were then affiliated to "high" and "low" group by careful examination of MRI images by an experienced examiner. The presence of high or low P-selectin signal was confirmed by measurement of signal void (see above). Clinical score was assessed for each mouse the day after (day 11 after induction) by an examiner blinded to the groups (low or high P-Sel). An equivalent strategy was used for prediction of remission.

MRI Analysis. The images of the organs were manually segmented using ImageJ. Lastly, 3D Otsu automated threshold was applied, and the signal void volume was computed (in percentage of the total organ volume). Results are presented as the volume of MPIOs-induced signal void divided by the volume of the structure of interest (in percentage). All analyses were performed by using ImageJ (Version 1.49e). All analyses were assessed by one examiner blinded to the clinical score and the type of EAE.

Kinetic of MPIOs-αP-Selectin Clearance. Consecutive high-resolution T2*-weighted images were acquired at different times after MPIOs-αP-selectin administration in CS2 EAE mice. For that, mice were injected with MPIOs-αP-selectin and 5 min after were placed in the MRI to start the first acquisition (10 min after the injection). Between each high-resolution T2*-weighted acquisition (10 min, 8 h, and 24 h), mice were placed in their cages and reanesthetized for each new MRI acquisition. The different parts of the spinal cord were always imaged in the same order (rostral spinal cord first and caudal spinal cord after, for a total of 22 min of acquisition).

Immunohistochemistry. Deeply anesthetized mice were transcardially perfused with cold heparinized saline (35 mL). Tissues were postfixed during 48 h at 4 °C (PBS 0.1 M, pH 7.4, containing 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid) and cryoprotected (sucrose 20% in veronal buffer; 24 h; 4 °C) before freezing in Tissue-Tek (Miles Scientific). Cryomicrotome-cut transversal sections (8–10 μm) were collected on poly-lysine slides and stored at −80 °C before processing. Sections were coincubated overnight with goat anti–P-selectin (1:1,000; R&D Systems), rabbit anti-laminin (1:1,000; Abcam), rat anti-CD4 (1:25; eBioscience), rabbit anti-CD3 (1:200; Abcam), rabbit anti-MBP (1:800 Abcam), sheep antifibrinogen, and mouse anti-SMI32 (1:800; Abcam). Primary antibodies were revealed by using Fab'2 fragments of donkey anti-rat, -rabbit, or -goat IgG linked to FITC or TRITC (1:600; Jackson ImmunoResearch). Washed sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI, and images were digitally captured by using a Leica DM6000 microscope-coupled coolsnap camera, visualized with Metavue software (Version 5.0; Molecular Devices), and further processed by using ImageJ software (Version 1.49e; NIH). All analyses were performed blinded to the experimental data.

The 3D Reconstruction. Images of double immunostaining (Laminin and P-selectin) were collected by using a Leica DM6000 microscope-coupled coolsnap camera. Images were taken with a z-step of 0.2 μm. The 3D structure of the vessel was reconstructed

from microscope images by using Imaris software (Version 5.5; Bitplane). Volume and surface functions were used.

In Vivo Vascular Permeability. Mice were deeply anesthetized with isoflurane 5% and maintained under anesthesia with 2% isoflurane in a 70%/30% gas mixture (N_2O/O_2) during surgery. The rectal temperature was maintained at 37 ± 0.5 °C throughout the surgical procedure by using a feedback-regulated heating system. A total of 200 μL of 2% Evans blue solution in saline was infused by i.v. injection. Evans blue was allowed to circulate for 4 h (mice awake in their cage), and mice were subsequently deeply anesthetized and perfused via the left ventricle with heparinized saline solution. Brain and spinal cords were excised and placed in optical imaging (Biospace), and Evans blue fluorescence was measured (excitation 650 nm, emission filter 700 nm). Fluorescence was quantified with the M3 Vision software (Biospace).

Platelet Depletion. Platelet depletion was accomplished by using purified rat monoclonal antibodies directed against mouse platelet GPIbα (CD42b), following manufacturer's recommendations (Emfret Analytics). GPIbα antibody (2 μg/g) was administered i.v. in EAE-mice (clinical score > 2) in the treated group 1 h before MPIOs-αP-selectin injection and MRI studies. Platelet depletion was confirmed by flow cytometry analyses on blood samples from the same mice. Blood cells were analyzed on a FACSVerse (Becton Dickinson) equipped with its accompanying software (FACSuite, Becton Dickinson) on 30,000 cells with size and granularity of red blood cells (RBCs) gate. When stated, anti-CD41 monoclonal antibody conjugated with FITC was added to the blood and incubated together for 20 min at room temperature to confirm platelet population.

Statistical Analysis. Results are presented as the mean ± SD. Sample size are indicated in Table S1 for each group. Normality tests were performed on all samples (D'Agostino–Pearson omnibus test and Shapiro–Wilk test). When normality could not be assumed, we used nonparametric tests (Kruskal–Wallis for multiple comparisons followed by Mann–Whitney's *U* test), which are the most stringent in these conditions. For correlations, Pearson or Spearman tests were used (respectively, when normality could or could not be assumed after normality tests).

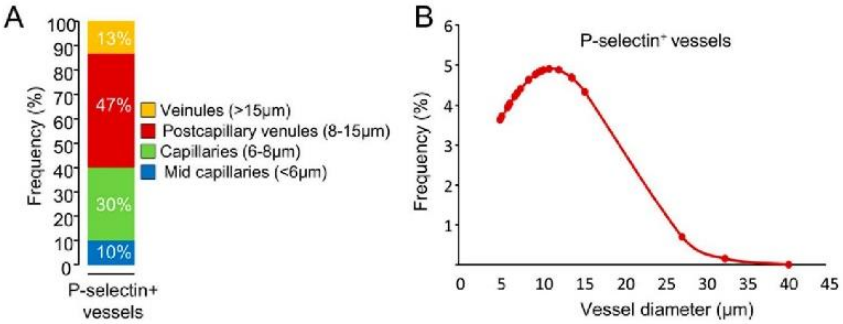


Fig. S1. P-selectin is mainly expressed in small vessels. (*A*) Proportion of sizes of P-selectin⁺ vessels. (*B*) Probability density curve of sizes of P-selectin⁺ vessels.

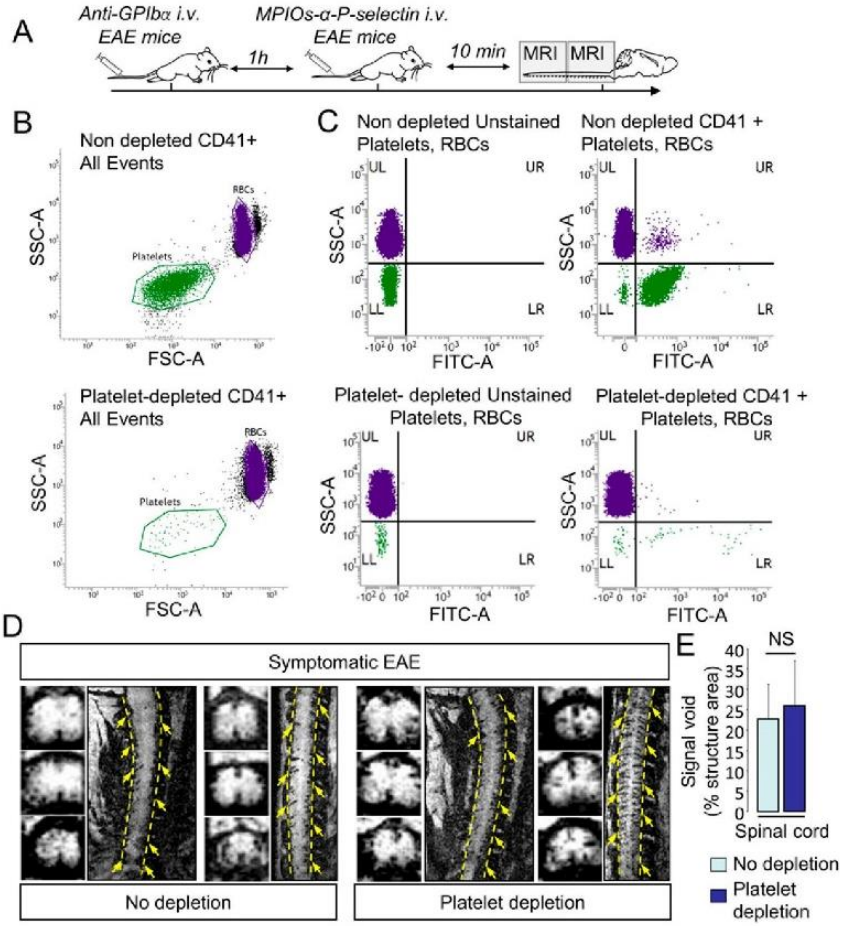


Fig. S2. MPIOs-αP-selectin–induced hyposignal is not due to binding in platelets. (*A*) Schematic representation of experimental design. (*B*) Flow cytometry analyses of anticoagulated whole blood in nondepleted and depleted animals. Forward- and side-scatter density plots show that RBC (purple dots) and platelet (green dots) populations are clearly distinguishable based on their respective light scatter patterns. (*C*) Box plot analyses of blood samples upon staining with anti-CD41 show platelet-positive events (green dots). (*D*) Representative high-resolution T2*-weighted images after MPIOs-αP-selectin injection in depleted (*Right*) and nondepleted (*Left*) animals. (*E*) Corresponding signal void quantification ($n = 4$ per group). NS, not significant.

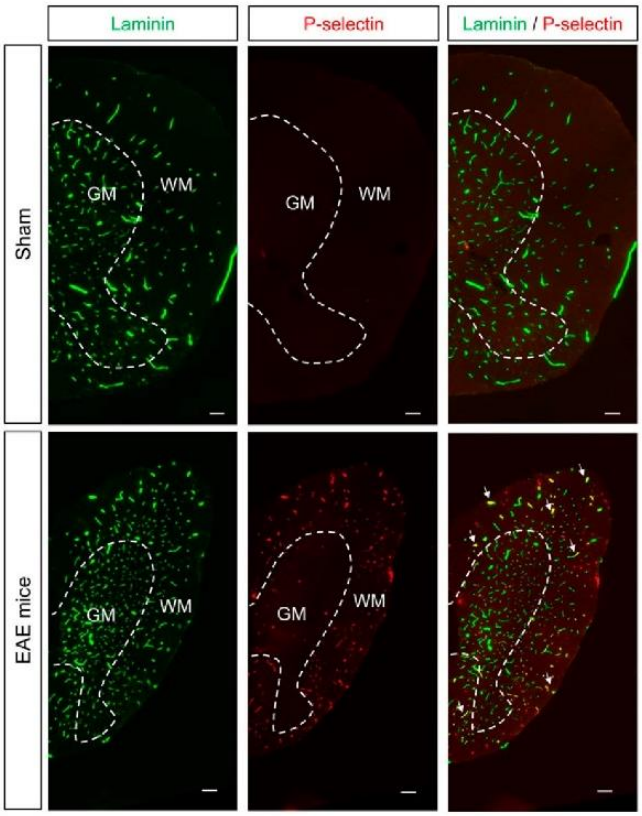


Fig. S3. P-selectin is expressed preferentially in the white matter. Representative immunohistological images of half spinal cord from thoracic PLP-induced EAE mice (first relapse) and sham mice. Green, laminin; red, P-selectin (n = 3 per group). (Scale bar: 100 μm.) GM, gray matter; WM, white matter.

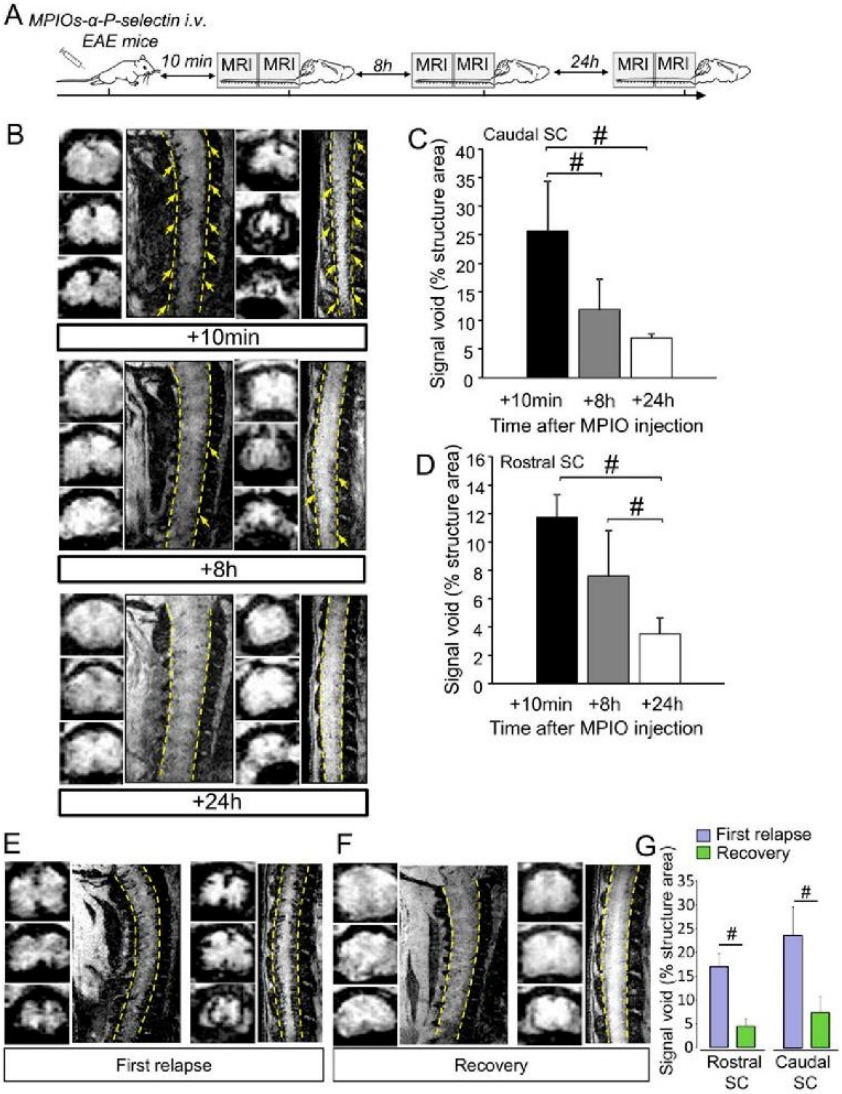


Fig. S4. MPIOs-αP-selectin enhanced MRI is compatible with longitudinal follow up of disease activity. (*A*) Experimental design of the longitudinal study of the MPIO-αP-selectin stall after i.v. injection. (*B*) Representative high-resolution T2*-weighted images after MPIOs-αP-selectin injection at indicated times (*Top*, +10 min; *Middle*, +8 h; *Bottom*, +24 h). (*C*) Corresponding signal void quantification of the caudal spinal cord ($n = 4$ per group). $^{\#}P < 0.05$. (*D*) Corresponding signal void quantification of the rostral spinal cord ($n = 4$ per group). $^{\#}P < 0.05$. (*E*) Representative axial and sagittal T2*-weighted images of the spinal cord of PLP-induced EAE mice during first relapse. (*F*) Representative axial and sagittal T2*-weighted images after MPIOs-αP-selectin of the same PLP-induced EAE mice (during recovery). (*G*) Corresponding signal void quantification of the caudal and rostral spinal cord ($n = 3$ per group). $^{\#}P < 0.05$.

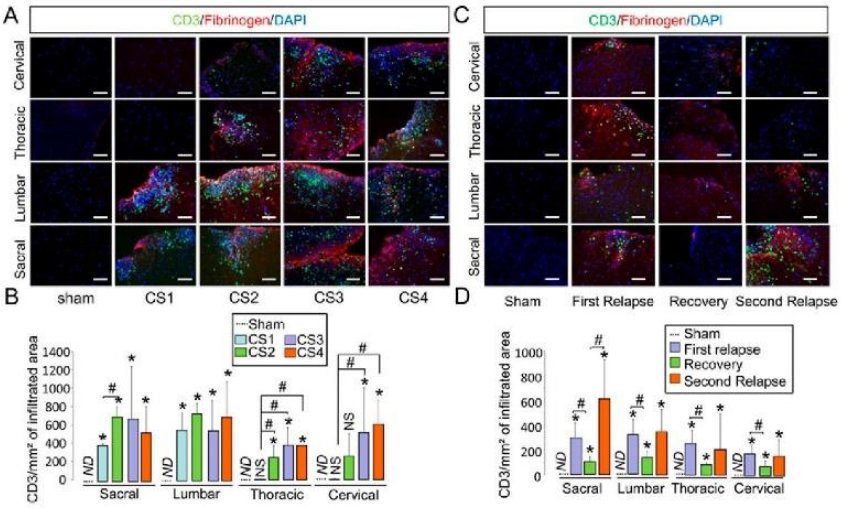


Fig. S5. Spatiotemporal dissemination of the CD3+ cell infiltration in the spinal cord of MOG- and PLP-induced EAE models. (*A*) Immunohistological images of the infiltrated areas of the MOG-induced EAE spinal cord. CD3+ leukocyte (green), fibrinogen (red), and cell nuclei (blue) show the spatiotemporal dissemination of immune cell infiltration. Each line of images corresponds to a spinal cord section (in order from top to bottom: cervical, thoracic, lumbar, and sacral). Each column corresponds to a clinical score (CS; CS1–CS4; $n = 3$ per group). (Scale bar = 50 μm.) (*B*) Corresponding quantification of the number of CD3+ T cells per infiltrated area in MOG-induced EAE. ND, nondetected; $^{*}P < 0.05$ vs. the same structure in sham animals; $^{\#}P < 0.05$ vs. indicated condition. $n = 3$ mice for each clinical group. (*C*) Immunohistological images of the infiltrated areas of the PLP-induced EAE spinal cord. CD3+ leukocyte (green), fibrinogen (red), and cell nuclei (blue) show the spatiotemporal dissemination of immune cell infiltration. Each line of images corresponds to a spinal cord section (in order from top to bottom: cervical, thoracic, lumbar, and sacral). Each column corresponds to a clinical score (CS; CS1–CS4; $n = 3$ per group). (Scale bar = 50 μm.) (*D*) Corresponding quantification of the number of CD3+ T-cells per infiltrated area in PLP-induced EAE. ND, nondetected; $^{*}P < 0.05$ vs. the same structure in sham animals; $^{\#}P < 0.05$ vs. indicated condition. $n = 3$ mice for each clinical group.

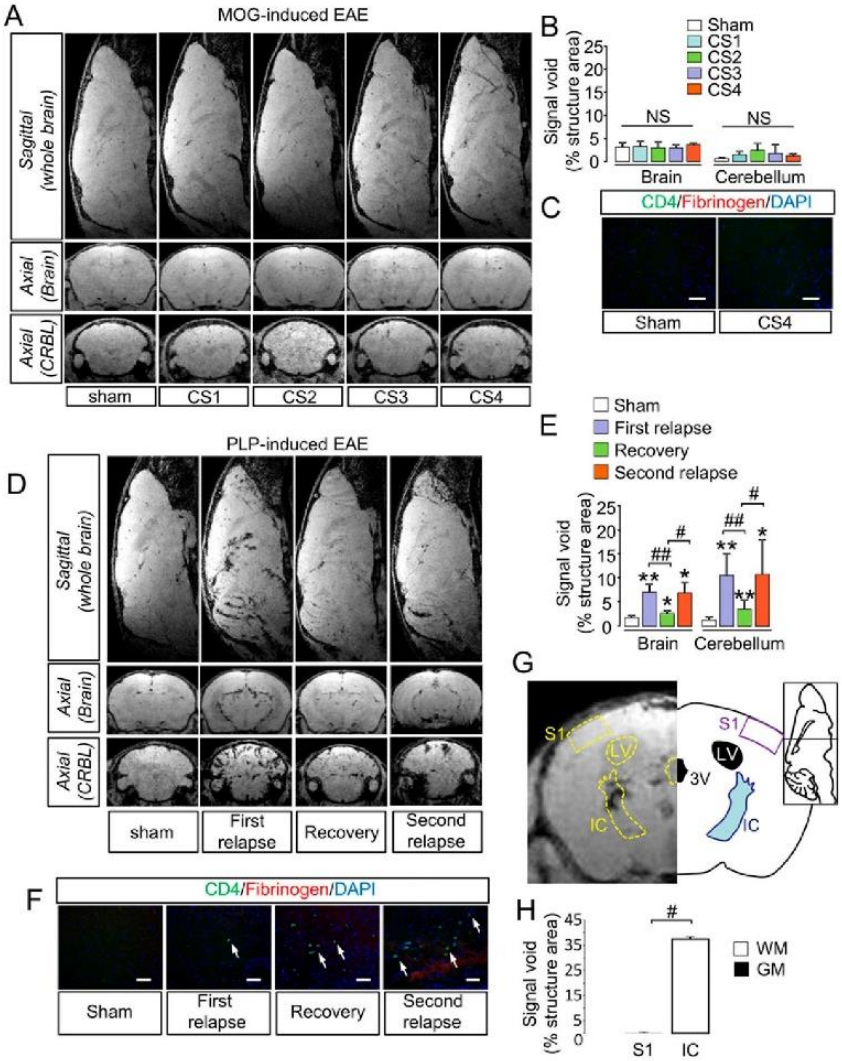


Fig. S6. MPIOs-αP-selectin–enhanced MRI allows measurement of endothelial activation in brain and cerebellum. (*A*) Representative axial and sagittal T2*-weighted images of brain and cerebellum (CRBL) after MPIOs-αP-selectin injection did not reveal induced signal void in MOG-induced EAE mice. (*B*) Quantification of MPIOs-αP-selectin–induced signal voids in brain and cerebellum of MOG-induced EAE. NS, not significant. (*C*) Immunohistological images of the MOG-induced EAE brain and cerebellum show the absence of CD4+ leukocytes infiltration. (*D*) Axial and sagittal molecular imaging of P-selectin (T2*-3D–weighted images) in PLP-induced EAE revealed increase in MPIOs-αP-selectin induced signal void in brain and cerebellum (CRBL) during the first relapse, and a decrease in MPIOs-αP-selectin signal void during the recovery. MPIOs-αP-selectin–induced signal void reappears during second relapse. (*E*) Quantification of MPIOs-αP-selectin induced signal voids in brain and cerebellum of PLP-induced EAE. $^{*}P < 0.05$; $^{**}P < 0.01$ vs. sham animals in the same structure; $^{\#}P < 0.05$; $^{\#\#}P < 0.01$ vs. indicated condition. $n = 4$–6 mice for each clinical group. (*F*) Representative immunohistological images of the infiltrated areas of the PLP-induced EAE brain. CD4 leukocyte (green), fibrinogen (red), and cell nuclei (blue) by epifluorescence microscopy allows observing the spatiotemporal dissemination of the immune cells infiltration. (*G*, *Right*) Distribution of MPIOs-αP-selectin induced signal voids in one white matter region (somatosensory cortex 1, S1) and one gray matter region (internal capsule, IC) in the brain, with corresponding atlas (*G*, *Left*). (*H*) Quantification of MPIOs-αP-selectin–induced signal voids in cerebral gray (somatosensory cortex 1 S1) and white matter (internal capsule, IC). $^{\#}P < 0.05$.

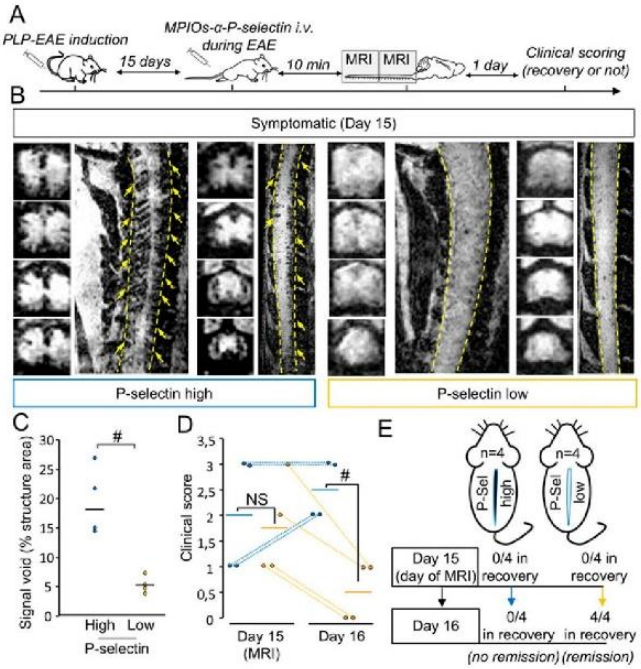


Fig. S7. MPIOs-αP-selectin–induced hyposignal predicts remission in PLP-induced EAE. (*A*) Experimental design. (*B*) Representative high-resolution T2*-weighted images after MPIOs-αP-selectin injection from PLP-induced EAE mice with deficits (first relapse, D15). Yellow arrows indicate signal voids. (*C*) Corresponding signal void quantification. $^{\#}P < 0.05$. $n = 4$ per group. (*D*) Clinical score analysis of P-selectin-high (blue line) or -low mice (yellow line) the day of MRI acquisition (day 15) and the day after (D16) ($n = 4$ per group) $^{\#}P < 0.05$. (*E*) Schematic representation of the main findings. See Table S1 for detailed sample size.

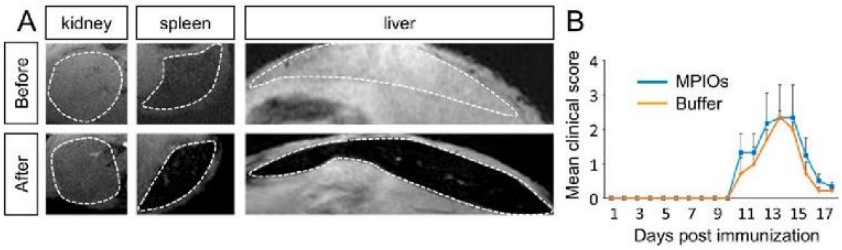


Fig. S8. Biodistribution of MPIOs after injection in EAE mice and effect on the shape of clinical score. (*A*) Representative T2*-weighted images before and 5 min after administration of MPIOs-αP-selectin in EAE mice, revealing a nonspecific uptake in the liver and the spleen. (*B*) EAE mice were injected with MPIOs (blue line) or buffer (orange line) at symptoms onset. Clinical score was assessed daily by one examiner blinded to the treatment ($n = 7$ per group).

Table S1. Group sizes and distributions

Group	*n*	Normality assumption
Fig. 1		
Before (rostral)	3	No
After MPIOs-αIgG (rostral)	3	No
After MPIOs-αP-selectin (rostral)	6	No
Before (caudal)	3	No
After MPIOs-αIgG (caudal)	3	No
After MPIOs-αP-selectin (caudal)	6	No
Fig. 2		
Sham (rostral)	3	No
Clinical score 1 (rostral)	3	No
Clinical score 2 (rostral)	4	No
Clinical score 3 (rostral)	4	No
Clinical score 4 (rostral)	3	No
Sham (caudal)	3	No
Clinical score 1 (caudal)	3	No
Clinical score 2 (caudal)	4	No
Clinical score 3 (caudal)	4	No
Clinical score 4 (caudal)	3	No
Fig. 4		
Sham (rostral)	4	No
First relapse (rostral)	6	No
Recovery (rostral)	4	No
Second relapse (rostral)	4	No
Sham (caudal)	4	No
First relapse (caudal)	6	No
Recovery (caudal)	4	No
Second relapse (caudal)	4	No
Fig. 6		
P-selectin-low	6	No
P-selectin-high	6	No
Fig. S7		
P-selectin-high	4	No
P-selectin-low	4	No

Number of animals (*n*) is given for each experimental group within corresponding figures, together with the result of normality assumption tests (D'Agostino–Pearson omnibus and Shapiro–Wilk tests).

Etude 2 : Imagerie moléculaire de l'inflammation intestinale

Contexte de l'étude

Les patients atteints de pathologies inflammatoires de l'intestin montrent une augmentation du risque de présenter des lésions du SNC ou des névrites optiques (Geissler *et al.*, 1995; Gupta, Gelfand and Lewis, 2005). Inversement, les patients atteints de SEP sont plus susceptibles de développer une pathologie auto-immune de l'intestin (Langer-Gould *et al.*, 2010). Ainsi, il semble exister des liens étroits entre les pathologies inflammatoires du SNC et de l'intestin.

Aujourd'hui, l'IRM est de plus en plus utilisée en clinique et permet un diagnostic et un suivi non invasif de nombreuses pathologies cérébrales. Cependant, des examens invasifs incluant des endoscopies et des biopsies sont encore nécessaires au diagnostic et au suivi des pathologies intestinales. Le développement d'une technique IRM capable de mesurer l'inflammation intestinale pourrait faciliter le diagnostic et le suivi des pathologies intestinales et pourrait permettre de prendre en compte l'inflammation intestinale dans le suivi des patients atteints de SEP.

Objectifs

- Développement d'une modalité d'IRM moléculaire adaptée à la détection et la mesure de l'inflammation intestinale.
- Utilisation de cette technique dans l'étude de l'inflammation intestinale d'un modèle de SEP.

Méthodes

Des séquences IRM adaptées à l'imagerie de l'intestin chez l'animal en respiration libre ont été utilisées dans des modèles d'inflammation systémique, de colite, d'ischémie mésentérique et de SEP. L'immunohistochimie a permis de vérifier la spécificité de la technique.

Principaux résultats

- En ciblant MAdCAM-1, l'IRM moléculaire permet la détection du niveau d'inflammation dans des modèles murins de pathologies intestinales.

- Cette technique est compatible avec le suivi longitudinal nécessitant la répétition de plusieurs examens chez le même sujet.

- L'IRM moléculaire de MAdCAM-1 met en évidence la présence d'une importante inflammation intestinale dans un modèle de SEP récurrente-rémittente.

Article en préparation

Etude 3 : Imagerie moléculaire de l'inflammation intestinale

Introduction

L'axe intestin-cerveau désigne les interactions et les influences que peut avoir l'intestin sur le cerveau (et inversement). De récentes études suggèrent que ce dernier pourrait jouer un rôle dans la SEP. En effet, il a été montré que les patients atteints de maladies inflammatoires de l'intestin ont un risque accru de développer des anomalies du SNC, comme des lésions de la substance blanche (Dolapcioglu *et al.*, 2013) ou des encéphalites (Aziz *et al.*, 2013). En accord avec ces données, il a été montré que le microbiote intestinal influe sur l'inflammation du SNC pendant l'EAE (Lee *et al.*, 2011) et qu'une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale a lieu pendant l'EAE chronique (Nouri *et al.*, 2014). Ainsi, les perturbations intestinales semblent jouer un rôle dans la physiopathologie de la SEP. Les objectifs de cette étude ont été de développer une technique d'IRM moléculaire *in vivo* permettant de visualiser l'inflammation intestinale puis de déterminer si cette technique permet de suivre l'activité de la maladie chez des souris atteintes d'un modèle de SEP récurrente-rémittente.

Matériel et Méthodes

Animaux

Les animaux utilisés dans cette étude sont des souris swiss mâles et des SJL/J femelles (8 semaines). Les animaux sont hébergés dans des cages standards répondant aux normes européennes de type 4, dans une pièce sous atmosphère de 20 à 30 Pa, maintenue sous une température de 21°C +/-1°C. Ces derniers sont nourris ad libitum, la litière et l'eau son changées toutes les semaines. Les expériences sur les animaux ont été effectuées conformément aux directives françaises (décret 87/848) et européennes (directive 86/609).

Modèle d'inflammation systémique induite par le LPS

Les souris swiss reçoivent une injection intrapéritonéale (i.p.) de LPS de E. coli (1 mg/kg, 0111: B4, Sigma-Aldrich, Lisle d'Abeau, France). Les IRM sont effectuées 48 heures après l'administration du LPS.

Ischémie mésentérique

Les souris swiss sont profondément anesthésiées avec 5% d'isoflurane dans un mélange contenant respectivement 30% et 70% d'O_2/N_20. Une fois l'anesthésie stabilisée, les souris sont maintenues sous anesthésie à 2,5% d'isoflurane dans un mélange 30% et 70% d'O_2/N_20 et sont placées sur le dos sur une couverture chauffante contrôlée par une sonde anale. L'abdomen de l'animal est rasé et nettoyé avec une solution alcoolisée. Une incision est réalisée sur l'abdomen afin d'extraire l'intestin grêle, et d'occlure l'artère mésentérique supérieure à l'aide de clamps vasculaires. L'intestin est placé entre deux compresses imbibées de solution saline afin d'éviter son asséchement. Après 60 minutes d'occlusion, les clamps sont retirés, l'intestin est replacé dans l'abdomen et la peau est suturée. Les mêmes manipulations sont réalisées pour les animaux contrôles, excepté que l'artère n'est pas occlue. Les animaux sont ensuite réveillés et replacés dans leur cage. Ils sont enfin surveillées de façon rapprochée jusqu'à l'examen IRM.

Modèle de colite aigue induit par le Dextran Sodium Sulfate (DSS)

Ce modèle est réalisé selon un protocole précédemment décrit (Wirtz *et al.*, 2007). Brièvement, le DSS (Sigma-Aldrich, Lisle d'Abeau, France) est dilué dans l'eau de boisson des souris swiss à une concentration de 4% pendant 8 jours. La solution est changée aux jours 3 et 5. Les animaux contrôles reçoivent la même eau de boisson sans DSS. Les animaux sont pesés quotidiennement à la même heure, et les scores cliniques suivant de consistance des selles et de saignement sont réalisés.

Score de consistance des selles : 0 : normal ; 1 : molles mais toujours formées ; 2 : très molles ; 3 : diarrhée liquide.

Score de saignement : 0 : rien d'anormal ; 1 : traces légères de sang au niveau de l'anus ; 2 : traces de sang visibles dans les selles ; 3 : saignement anal important.

Encéphalite auto-immune expérimentale

L'EAE est induite chez des souris SJL/J femelles de 8 semaines (Janvier) via une immunisation avec 200µg de protéine protéolipidique recombinante ($PLP_{139-151}$, Eurogentec) dans une émulsion mélangée (rapport volumique 1: 1) avec adjuvant complet de Freund (CFA; Difco Laboratories) contenant 800 µg de Mycobacterium tuberculosis H37Ra (MBT; Difco). Les animaux contrôle (CFA) sont injectés avec une solution saline mélangée avec du CFA contenant 800 µg de MBT. L'émulsion est administrée grâce à des injections sous-cutanées situées au niveau de l'épaule et des flancs (quatre sites au total, 50 µL à chaque site d'injection). Une injection intrapéritonéale de 200 ng de toxine dérivée de Bordetella pertussis (Sigma-Aldrich) dans 200µL de solution saline est réalisée sur l'ensemble des animaux 48 heures après l'immunisation.

Préparation des tissus

Les animaux sont anesthésiés dans un premier temps avec 5% d'isoflurane dans un mélange contenant respectivement 30 et 70% d'O_2 et N_20 respectivement. Une fois l'anesthésie stabilisée, les souris sont maintenues sous 3% d'isoflurane dans un mélange contenant 30% et 70% d'O_2/N_20. Les animaux sont perfusés par voie intra-cardiaque avec 50ml de liquide physiologique hépariné (0,9%) à un débit de 15ml/minute. Les tissus sont ensuite prélevés et fixés pendant 48h dans un mélange contenant 0,2% d'acide picrique et 2% de paraformaldéhyde dans du tampon phosphate 0,1mol/L à pH 7,4. Les tissus sont cryoprotégés durant 24h dans du tampon phosphate contenant 20% de sucrose et inclus dans un milieu d'enrobage (Tissue freezing medium, Leica) et congelés à -80°C jusqu'à utilisation. Ils sont ensuite coupés à l'aide d'un cryotome (Leica CM3050), avec une épaisseur de coupe de 10µm. Ces coupes sont récoltées sur des lames recouvertes de poly-lysine et stockées à -80°C.

Immunohistochimie

Les lames sont passées dans quatre bains de tampon Coons azide (contenant du véronal sodique, du chlorure de sodium, de l'acide chlorhydrique, de l'azide et de l'eau) à un pH 7,4. Les anticorps primaires sont dilués dans du tampon Coons azide contenant 0,25% de Triton. Les lames sont incubées en chambre humide avec les anticorps primaires (anti-collagène-4 de chèvre, 1/800e, SouthernBiotech et anti-MAdCAM-1 de rat, 1/1000e,

BioLegend) pendant une nuit à température ambiante. Le lendemain, les lames sont rincées dans un tampon Coons azide. Les anticorps primaires fixés sont révélés grâce à des anticorps secondaires dilués au 1/600e dans du tampon Coons azide pH 7,4 avec 0.25% de Triton. Les lames sont incubées avec les anticorps secondaires pendant 1h30 à température ambiante. Les coupes, une fois rincées, sont montées entre lame et lamelle dans un milieu de montage contenant du DAPI, marquant l'ADN nucléaire et donc les noyaux cellulaires. La spécificité des immuno-marquages est vérifiée avec des tests immunohistologiques classiques. Les coupes sont ensuite examinées avec un microscope à épifulorescence (DM6000B ; Leica), les images digitales sont acquises en utilisant une caméra (C11440 ; Hamamatsu) et le logiciel MetaMorph (Leica).

Couplages de MPIOs avec les anticorps

Les anticorps de rat anti-MAdCAM-1 (120702; BioLegend) ou anti-IgG (Jackson ImmunoResearch) sont couplés aux MPIOs (diamètre 1,08 µm) dans du tampon borate (pH 9,5) par incubation à 37 ° C pendant 48 h. Un total de 40 µg d'anticorps est utilisé pour 1 mg de MPIO. Les MPIOs sont ensuite lavés dans du PBS contenant 0,5% de BSA à 4°C et incubés pendant 24h à température ambiante, pour bloquer les groupes actifs restants. Les MPIOs sont rincés dans du PBS (0,1% de BSA). Pour désagréger les agrégats de MPIO, une procédure de sonication à faible intensité est effectuée pendant 60s. Par la suite, les MPIOs sont stockés à 4°C dans un tampon PBS sous agitation constante pour empêcher la formation d'agrégats.

Imagerie par résonnance magnétique (IRM)

Une IRM pondérée en T2* (résolution spatiale de 150 µm × 75 µm × 75 µm, résolution isotrope de 75 µm, TE/TR 8.6/200 ms et un angle de basculement (FA) de 25 °) est effectuée pour visualiser les MPIO (temps d'acquisition = 10 min) dans le système nerveux central. Une deuxième séquence d'IRM pondérée en T2* (résolution spatiale de 380µm × 98µm × 98µm, résolution isotrope de 98 µm, TE/TR 4.7/153 ms et un angle de basculement (FA) de 30°) est effectuée pour visualiser les MPIO (temps d'acquisition = 2min37s) dans l'intestin grêle et le colon. Toutes les images pondérées en T2* à haute résolution de cette étude sont des projections d'intensité minimale de trois tranches consécutives. Le cas échéant, les souris reçoivent de manière aléatoire des MPIOs-αIgG, des MPIOs-αMAdCAM-1 ou des MPIOs-αP-sélectine. Bien que les injections de MPIOs soient effectuées en dehors de l'aimant,

les positions des souris pendant les acquisitions pré et post-MPIOs ne changent pas (les souris sont placées exactement à la même position et ne sont pas retirées du support).

Afin de d'obtenir une imagerie intestinale spécifique et de bonne résolution, les animaux sont privés de nourriture 24h avant l'examen IRM, et le contenu de leur tube digestif est éliminé par l'administration de colopeg ® (qui est ajouté à l'eau de boisson). Deux heures avant l'examen IRM, du phloroglucinol (spasfon®) est administré aux souris par voie orale afin de limiter les mouvements importants de l'intestin pendant l'acquisition des images IRM.

Expérience de compétition

Afin d'évaluer la spécificité des MPIOs, l'anticorps anti-MAdCAM-1 seul est injecté une heure avant l'injection des MPIOs-αMAdCAM-1. Pour cela, les animaux LPS sont anesthésiés afin de réaliser la pose des cathéters veineux et les injections d'anticorps anti-MAdCAM-1 ou d'IgG. Ensuite, les animaux sont réveillés et replacés dans leur cage. Une heure après, les animaux sont ré-anesthésiés pour la réalisation de l'imagerie.

Résultats

I. Mise au point de l'IRM moléculaire spécifique de l'inflammation intestinale.

Dans un premier temps, dans le but de développer les séquences IRM et de déterminer la molécule d'adhésion la plus adaptée à la détection de l'inflammation intestinale, un modèle d'inflammation systémique induit par l'injection de lipopolysaccharide (LPS) comprenant classiquement une inflammation intestinale a été utilisé. La première étape de cette étude a consisté à déterminer la molécule d'adhésion vasculaire la plus spécifique de l'inflammation intestinale. Ayant montré des résultats concluants pour la détection de l'inflammation précoce du SNC, notre premier choix s'est tourné vers la P-sélectine. Cependant, l'injection de MPIOs-αP-sélectine dans ce modèle d'inflammation induit par le LPS ne montre aucune chute de signal T2* dans l'intestin (figure 1).

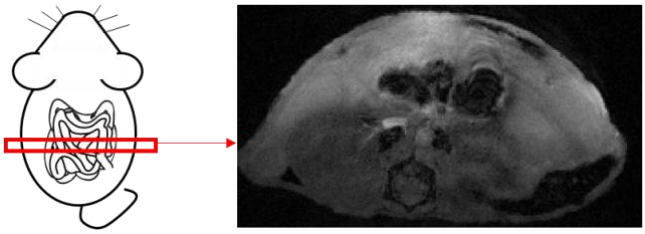


Figure 1 : Image représentative de l'intestin grêle de souris soumises à une inflammation systémique (LPS) après injection de MPIOs-αP-sélectine (séquence pondérée en T2*).

Notre second choix s'est tourné vers la molécule intestinale d'adhésion vasculaire MAdCAM-1 (pour Mucosal vascular Addressin Cell Adhesion Molecule 1). En effet, MAdCAM-1 a été proposé comme marqueur de l'inflammation intestinale. Il est régulé à la hausse sur l'endothélium intestinal au stade très précoce des pathologies inflammatoires de l'intestin a et est responsable du recrutement des lymphocytes T (Arihiro *et al.*, 2002; Souza *et al.*, 1999). L'injection i.v. de MPIOs-αMAdCAM-1 provoque une chute de signal T2* dans l'intestin grêle des souris atteintes d'inflammation systémique, mais pas chez les souris contrôles (figure 2).

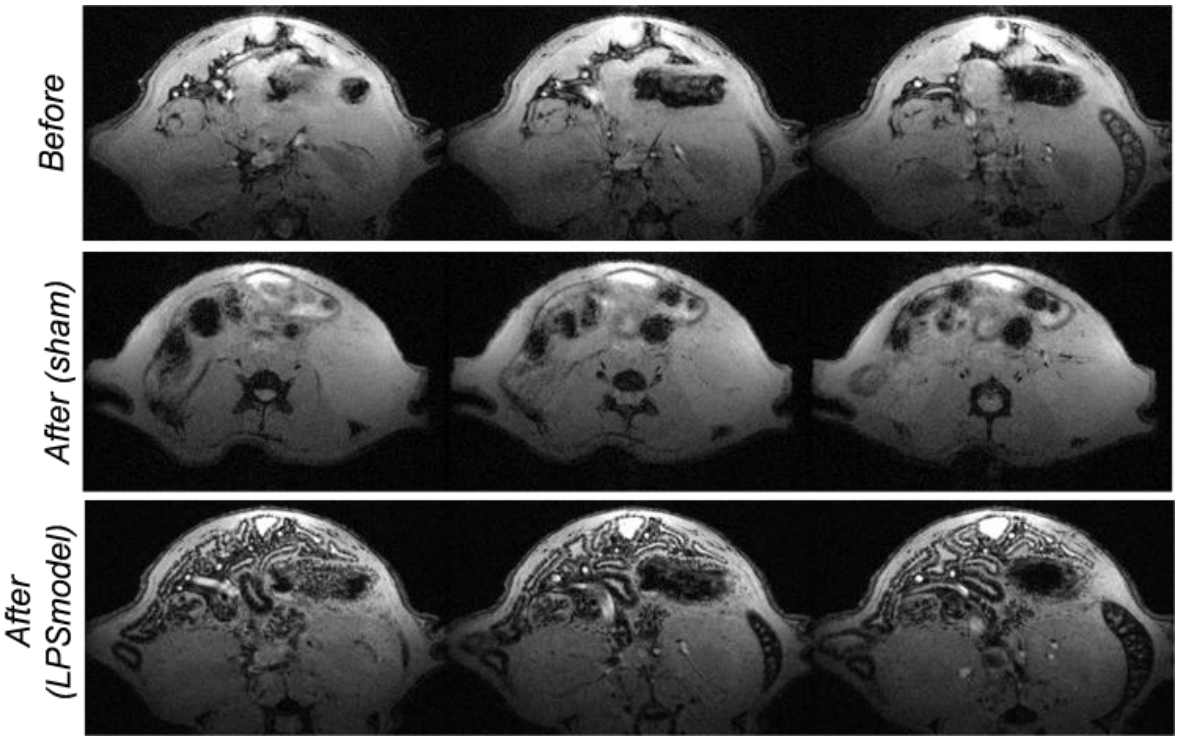


Figure 2 : **L'IRM moléculaire de MAdCAM-1 révèle l'inflammation de l'intestin grêle dans un modèle d'inflammation systémique.** Images représentatives de l'intestin grêle de souris contrôles ou soumises à une inflammation systémique (LPS) avant et après l'injection de MPIOs-αMAdCAM-1 (séquence pondérée en T2*).

Cette technique fonctionne également pour le colon. En effet, l'injection i.v. de MPIOs-αMAdCAM-1 provoque une chute de signal T2* dans le colon des souris atteintes d'inflammation systémique. Aucun signal important n'est observé chez les souris contrôles (figure 3).

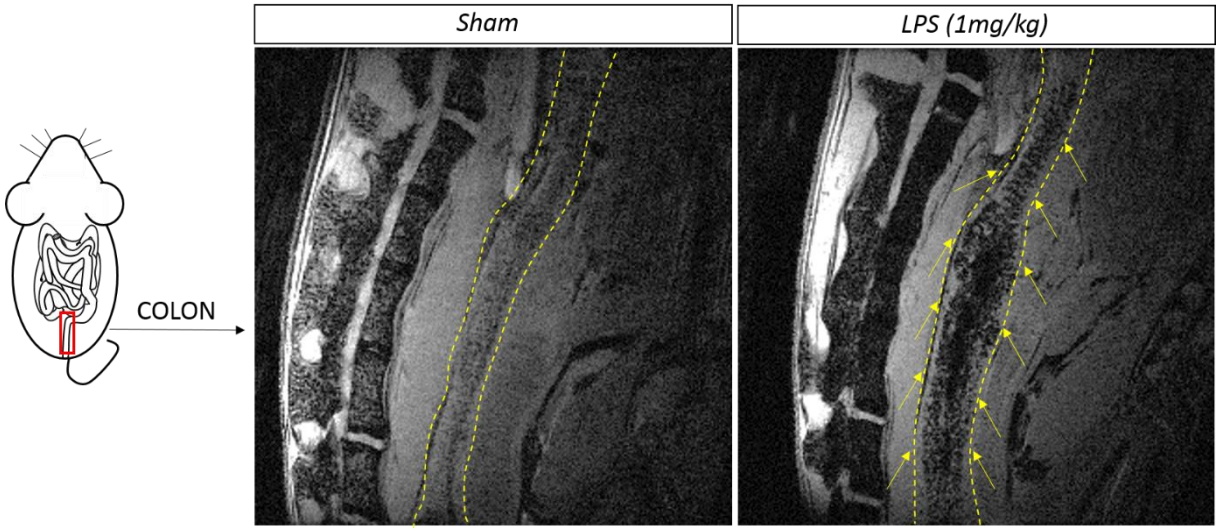


Figure 3 : L'IRM moléculaire de MAdCAM-1 révèle l'inflammation du colon dans un modèle d'inflammation systémique. Images représentatives d'IRM moléculaire de colon (délimité en jaune) de souris contrôles ou soumises à une inflammation systémique induite par le LPS. Les MPIOs-αMAdCAM-1 sont visibles en hyposignaux (flèches jaunes).

Les MPIOs-αMAdCAM-1 étant capables de détecter l'inflammation intestinale, notre prochaine étape a consisté à évaluer leur spécificité. Après l'examen IRM, les animaux ont été perfusés et des immuno-marquages ont été réalisés sur des coupes de leurs intestins grêles. Nous montrons que les MPIOs-αMAdCAM-1 se fixent seulement dans les vaisseaux positifs pour MAdCAM-1. Aucun MPIO n'est retrouvé en dehors de la lumière des vaisseaux (figure 4).

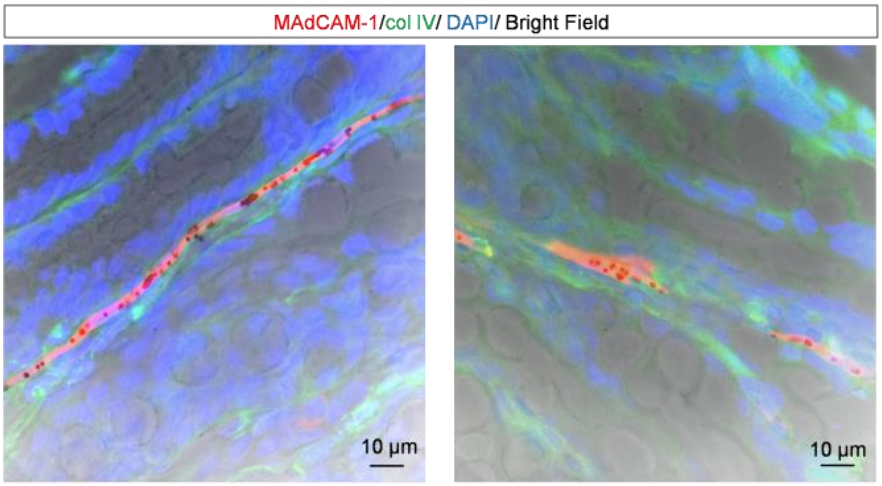


Figure 4 : Images immuno-histologiques de vaisseaux intestinaux (marqués en vert par col IV) de souris LPS après injection de MPIOs-αMAdCAM-1. Les MPIOs-MAdCAM-1 se lient seulement dans la lumière des vaisseaux positifs pour MAdCAM-1 (marqués en rouges).

L'inflammation peut induire des phénomènes d'augmentations de la perméabilité vasculaire. L'IRM moléculaire ayant pour but de détecter les molécules d'adhésions vasculaire, il est important que le signal observé ne soit pas dû à une extravasation des MPIOs. En accord avec le fait que le signal induit par les MPIOs n'est pas dû à des phénomènes de microthromboses ou à une extravasation de ces derniers, l'injection de MPIOs-αIgG contrôles n'induit pas de chute du signal dans l'intestin grêle et dans le colon des animaux LPS (figure 5).

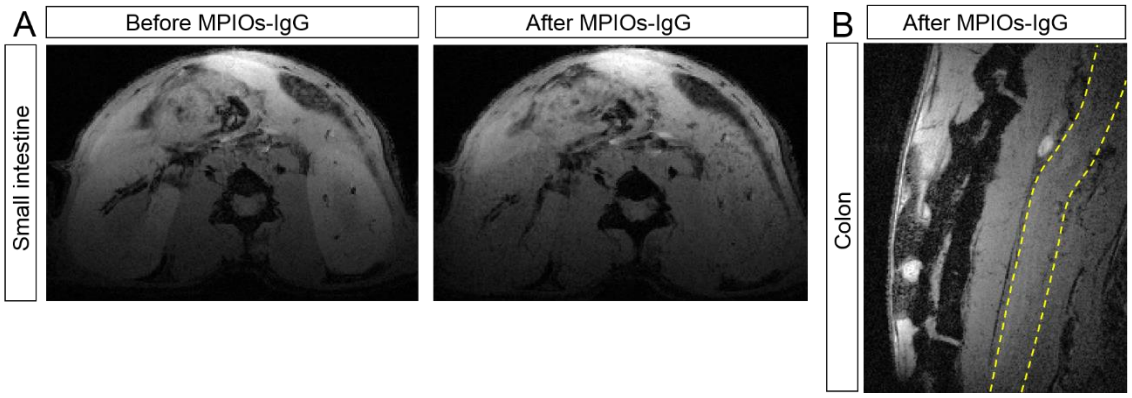


Figure 5 : La spécificité de l'IRM moléculaire de MAdCAM-1 n'est pas due à une microtrombose ou une extravasation des MPIOs. L'injection de MPIOs-αIgG n'induit pas de chute de signal dans l'intestin grêle **(A)** ou le colon **(B)** des animaux soumis à une inflammation induite par l'injection de LPS.

Afin de confirmer que le signal observé est bien dû à la fixation des MPIOs sur la protéine MAdCAM-1, une expérience de compétition a été réalisée dans le modèle LPS. L'injection d'un anticorps anti-MAdCAM-1 une heure avant l'injection des MPIOs-αMAdCAM-1 empêche la fixation de ces derniers (figure 6B). L'injection d'IgG contrôles ne modifie pas la fixation des MPIOs-αMAdCAM-1 (figure 6A).

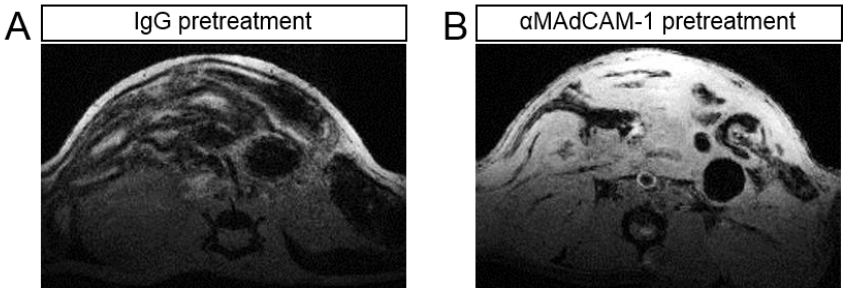


Figure 6 : Le signal induit par les MPIOs-αMAdCAM-1 est dû à leur fixation sur la protéine MAdCAM-1. (A) L'injection d'IgG n'empêche pas la fixation des MPIOs. **(B)** l'injection de l'anticorps anti-MAdCAM-1 prévient la fixation des MPIOs.

En accord avec la littérature qui montre que MAdCAM-1 n'est pas exprimé par les cellules endothéliales du SNC (Steffen *et al.*, 1996), les séquences IRM réalisées sur les cerveaux des souris du modèle LPS montrent que les MPIOs-αMAdCAM-1 ne se fixent pas dans le SNC (figure 7), démontrant ainsi la spécificité de cette technique pour l'intestin.

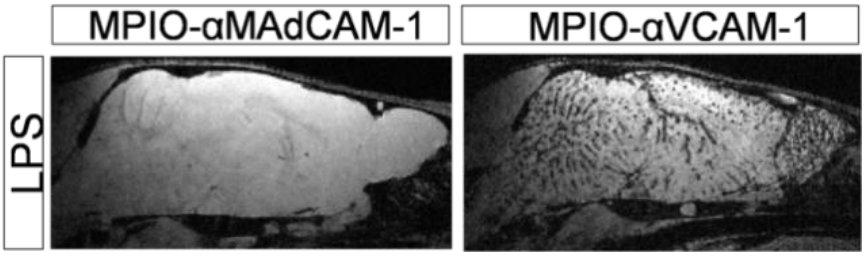


Figure 7 : Séquences pondérées en T2* de cerveaux d'animaux 48h après l'injection de LPS. Aucune fixation de MPIOs-αMAdCAM-1 n'est observée malgré l'inflammation cérébrale dévoilée par les MPIOs-αVCAM-1.

Afin d'évaluer la compatibilité de cette technique avec la réalisation d'examens répétés, des IRM moléculaires ont été réalisées avant et à différents temps après l'injection des MPIOs-αMAdCAM-1 (10 minutes, 1 heure, 4 heures et 24 heures après injection) (figure 8). Aucun signal n'est observé avant l'injection des MPIOs aussi bien dans l'intestin grêle (figure 8A) que dans le colon (figure 8B) des animaux LPS. Inversement, un important signal est observé 10 minutes après l'injection des MPIOs. De façon intéressante, une disparition du signal est observée de manière dépendante au temps. Ainsi, très peu de signal persiste 4h

après l'injection des MPIOs, pour être complètement absent 24h après l'injection. Les cinétiques de décrochage des MPIOs sont semblables pour l'intestin grêle (figure 8A) et le colon (figure 8B).

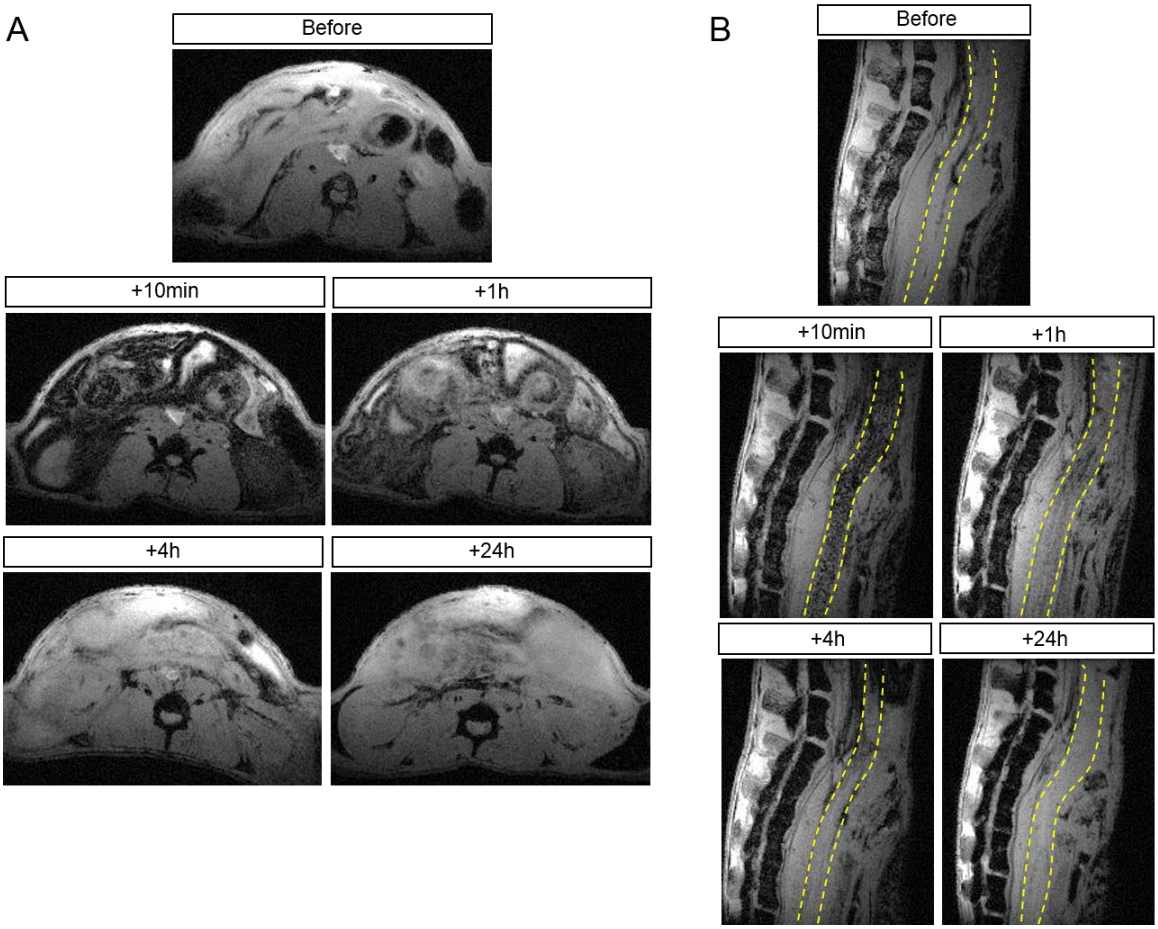


Figure 8 : L'IRM moléculaire de MAdCAM-1 est compatible avec le suivi longitudinal de l'inflammation intestinale. (A) IRM moléculaire de MAdCAM-1 de l'intestin grêle avant et 10 minutes, 1 heure, 4 heures et 24 heures après l'injection des MPIOs-αMAdCAM-1. **(B)** IRM moléculaire de MAdCAM-1 du colon avant et 10 minutes, 1 heure, 4 heures et 24 heures après l'injection des MPIOs-αMAdCAM-1.

II. L'IRM moléculaire de MAdCAM-1 détecte l'inflammation dans des modèles de colite et d'ischémie mésentérique.

Par la suite, dans le but d'être plus proche de la clinique, des examens d'IRM moléculaires de MAdCAM-1 ont été réalisés sur un modèle de colite intestinale induite par l'administration orale de dextran sodium sulfate (DSS) (figure 9). En accord avec la pathologie

humaine, une perte de poids (figure 9A) accompagnée de saignements (figure 9B) et d'une perte de consistance des selles (figure 9C) sont observés dès 6 jours après de début du traitement au DSS. Le suivi longitudinal des animaux avec l'IRM moléculaire de MAdCAM-1 démasque une inflammation qui croît avec le temps, pour devenir maximale au jour 11 (figure 9D).

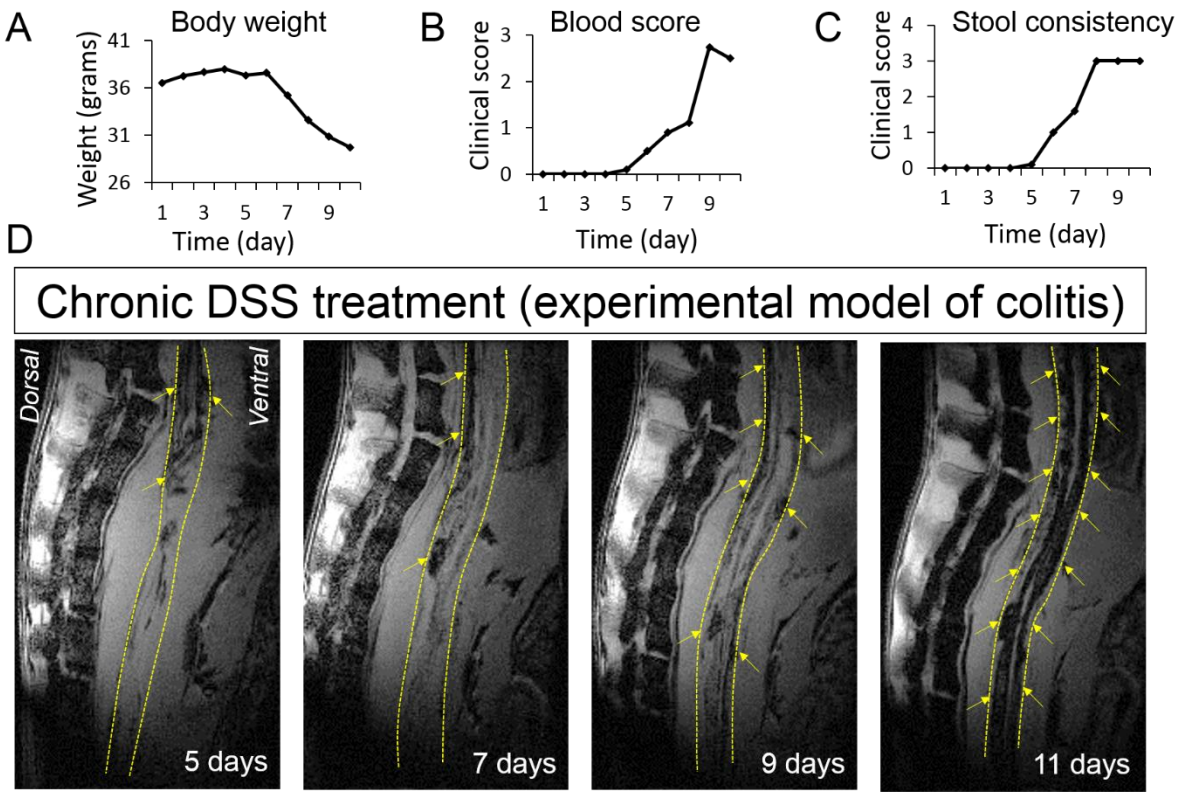


Figure 9 : L'IRM moléculaire de MAdCAM-1 révèle l'augmentation de l'inflammation du colon dans un modèle de colite. (A) La diminution du poids des animaux débute après une semaine de traitement au DSS. **(B)** Les saignements s'intensifient au cours du temps pour atteindre un pic à 9 jours. **(C)** La perte de consistance des selles débute après 6 jours de traitement au DSS, et devient maximale après 8 jours. **(D)** Le signal induit par les MPIOs-αMAdCAM-1 augmente avec l'aggravation clinique des animaux soumis au traitement avec du DSS.

L'ischémie mésentérique est due à l'occlusion d'une ou de plusieurs artères irriguant l'intestin (Hohenwalter, 2009). L'IRM n'apportant pas d'avantage par rapport au scanner, elle n'est aujourd'hui pas utilisée en clinique dans le diagnostic de cette pathologie mortelle. Ainsi, la détection de la surexpression de MAdCAM-1 avec l'IRM pourrait s'avérer bénéfique dans le diagnostic de l'ischémie mésentérique. L'étape suivante de cette étude a ainsi consisté à tester la capacité de l'IRM moléculaire à révéler l'inflammation intestinale dans un modèle

murin d'ischémie mésentérique. 48h après l'ischémie (occlusion de 60 minutes, puis reperfusion), l'IRM moléculaire de MAdCAM-1 révèle une activation vasculaire visible en hyposignaux dans la région ischémiée (Figure 10B). Aucun signal n'est détecté chez les animaux contrôles (figure 10A).

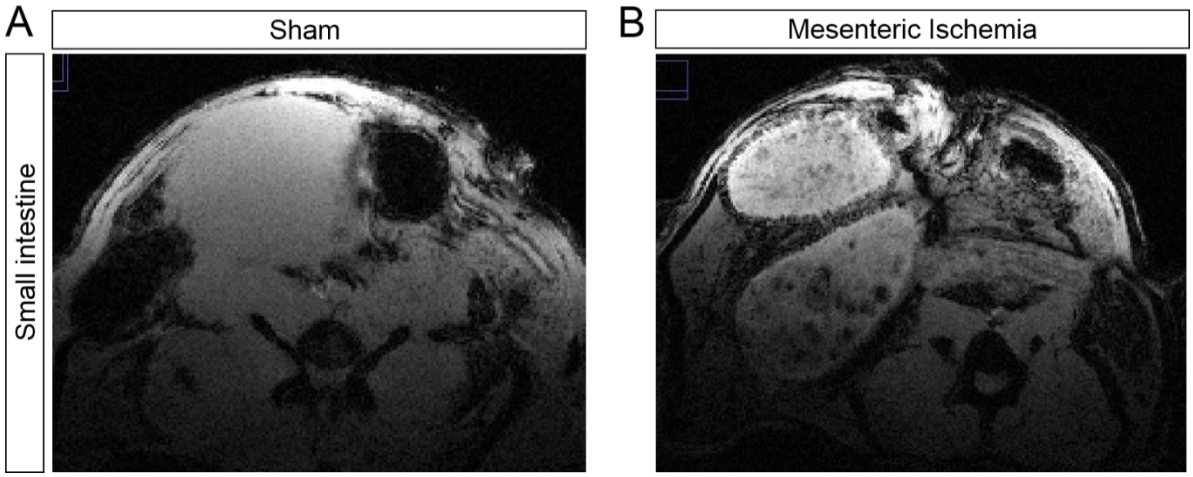


Figure 10 : L'IRM moléculaire de MAdCAM-1 révèle l'inflammation intestinale dans un modèle d'ischémie mésentérique. (A) Image représentative d'IRM moléculaire de MAdCAM-1 des animaux contrôles, chez lesquels l'ensemble des manipulations chirurgicales ont été réalisées à l'exception de l'occlusion des artères mésentériques. **(B)** Image représentative d'IRM moléculaire de MAdCAM-1 des animaux ayant subi une occlusion des artères mésentériques. Les IRM moléculaires sont effectuées 48h après la reperfusion.

Ainsi, la première partie de cette étude a consisté en la mise au point d'une technique d'IRM moléculaire adaptée à l'imagerie de l'inflammation intestinale. Pour cela, les MPIOs ont été couplé à des anticorps reconnaissant la protéine intestinale d'adhésion vasculaire MAdCAM-1. Cette technique s'est avérée efficace dans la détection de l'activation vasculaire de différents modèles de pathologies intestinales, comme des modèles d'inflammation systémique, de colite ou d'ischémie mésentérique. De manière intéressante, cette technique n'est pas adaptée à la détection de l'inflammation du SNC, et n'interfère donc pas avec l'IRM moléculaire de la P-sélectine. La seconde étape de ce projet a consisté en l'utilisation de l'IRM moléculaire de MAdCAM-1 et de P-sélectine dans l'étude de l'axe intestin-cerveau dans un modèle de SEP.

III. L'IRM moléculaire de MAdCAM-1 démasque l'inflammation intestinale dans l'EAE récurrente-rémittente.

Afin d'étudier l'inflammation du SNC et de l'intestin dans un modèle de SEP récurrente-rémittente, deux types de MPIOs ont été utilisés. Dans un premier temps, les MPIOs-αMAdCAM-1 sont injectés en i.v. et l'animal est placé de façon à imager l'intestin, en laissant le cathéter veineux en place. Une fois l'acquisition des images de l'intestin terminée, les MPIOs-αP-sélectine sont injectés par le même cathéter et l'animal est replacé de façon à imager le SNC.

Les signaux IRM induits par les MPIOs-αMAdCAM-1 révèlent que l'activation endothéliale de l'intestin a lieu pendant la phase active de la maladie (pendant la poussée). Cette inflammation intestinale survient ainsi pendant l'activation vasculaire du SNC. Au contraire, cette inflammation diminue aussi bien dans l'intestin que dans le SNC pendant la récupération (figure 8). Ainsi, l'inflammation intestinale semble suivre l'inflammation du SNC révélée par les MPIOs-αP-sélectine. L'inflammation intestinale, qui est plus faible chez les animaux contrôles, indique que l'inflammation observée dans l'EAE n'est pas due à l'injection des adjuvants injectés pendant l'induction (figure 11).

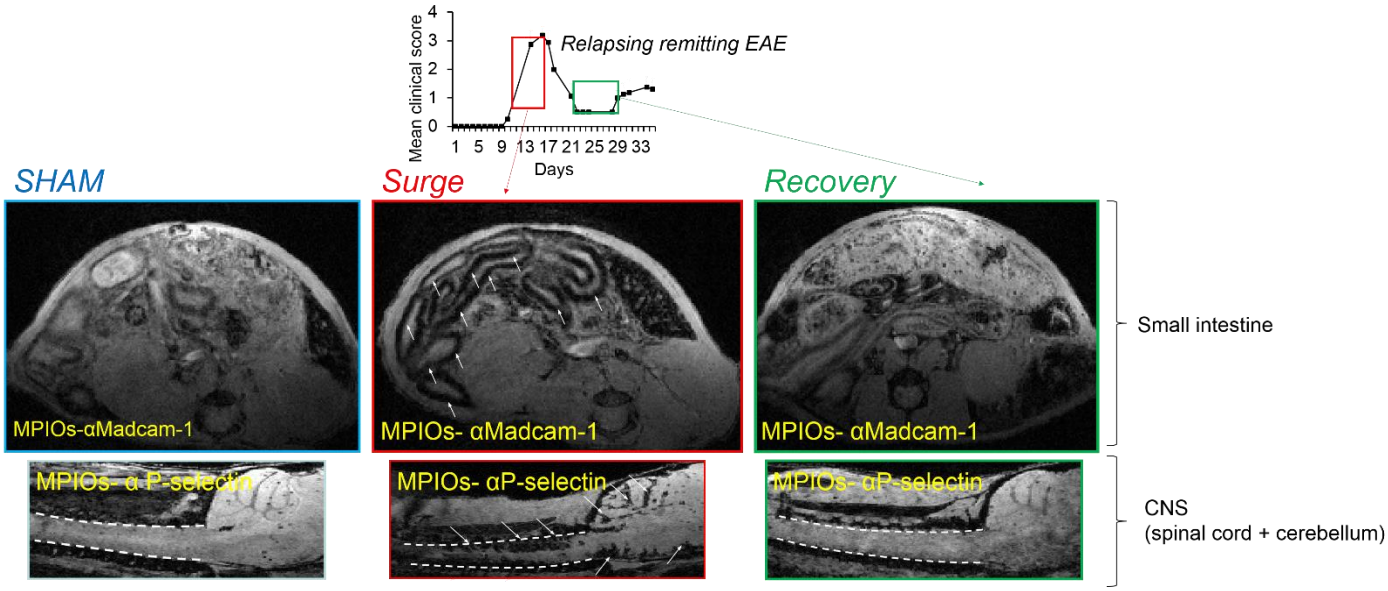


Figure 11 : L'IRM moléculaire de MAdCAM-1 démasque l'inflammation intestinale pendant la poussée de l'EAE. À gauche: l'imagerie moléculaire de la P-Sélectine et de MAdCAM-1 ne révèle pas de chute du signal induit par les MPIOs dans l'intestin et le SNC des animaux simulés. En retour, l'imagerie moléculaire de la P-Sélectine et de MAdCAM-1 révèle une chute du signal induit par les MPIOs dans l'intestin et le SNC au cours de la poussée (images du milieu) et une disparition du marquage pendant la récupération (images de droite).

IV. Conclusion

Cette étude fait état pour la première fois d'IRM moléculaire de l'intestin. En ciblant la protéine MAdCAM-1, nous montrons qu'il est possible de détecter de manière précise l'inflammation intestinale et ainsi de démasquer les perturbations ayant lieu dans différents modèles de pathologies intestinales et pendant les poussées d'un modèle murin de SEP. Cette étude pourrait faciliter le diagnostic des pathologies inflammatoires de l'intestin et pourrait aider à prendre en compte la gestion de l'inflammation dans les soins aux patients atteints de SEP.

Etude 3 : Une voie péri-vasculaire entraîne la circulation du liquide céphalo-rachidien dans la moelle épinière de la souris et est modifiée dans un modèle de sclérose en plaques

Contexte de l'étude

Le flux de LCR dans le parenchyme du cerveau est décrit chez la souris sous le concept de « système glymphatique » (Iliff *et al.*, 2012). Brièvement, le LCR circule dans le tissu cérébral en passant des espaces péri-artériels vers les espaces péri-veineux, entrainant avec lui les déchets cellulaires contenus dans le cerveau. Le fonctionnement de ce dernier est connu pour être perturbé dans de nombreux modèles de pathologies cérébrales.

Bien qu'il soit décrit dans le cerveau, aucune étude ne fait état d'un tel système dans la moelle épinière, ni d'une possible altération de ce dernier dans les modèles de sclérose en plaques.

Objectifs

- Mise en évidence de l'existence d'un système glymphatique dans la moelle épinière des souris.
- Etude du système glymphatique dans un modèle murin de SEP.

Méthodes

Une injection de Gadolinium dans la grande citerne (*cisterna magna*) suivie d'examens IRM ont permis d'analyser le système glymphatique (Gaberel *et al.*, 2014). L'imagerie optique *ex vivo* nous a permis d'étudier la diffusion d'un marqueur fluorescent (Indocyanine green) après son injection dans la grande citerne. Enfin, l'immunohistochimie nous a permis d'observer l'expression d'aquaporine-4 et l'infiltration leucocytaire dans la moelle épinière d'un modèle de SEP.

Principaux résultats

- Un système glymphatique, semblable à celui précédemment observé dans le cerveau, est présent dans le parenchyme de la moelle épinière des souris.
- Le système glymphatique est altéré dans la moelle épinière, mais pas dans le cerveau, d'un modèle murin de SEP.
- En accord cela, nous montrons dans la moelle épinière du même modèle, une perturbation de la polarisation de l'expression de l'aquaporine-4 et une accumulation de cellules dans les espaces péri-vasculaires.

Article soumis

A perivascular pathway drives cerebrospinal fluid circulation in the mouse spinal cord and is altered in a model of multiple sclerosis.

Antoine Philippe Fournier, Maxime Gauberti, Aurélien Quenault, Denis Vivien, Richard Macrez & Fabian Docagne.

Abstract: Cerebrospinal fluid (CSF) flux is drained from the brain parenchyma via a perivascular pathway. This pathway functions by the virtue of the water channel aquaporin 4 (AQP4) expressed on astrocyte end feet surrounding cerebral microvessels within the parenchyma. Here we report that this pathway also exists in the spinal cord parenchyma of the mouse. By using an intragate T1-weighted high-resolution MRI of the spinal cord of freely breathing mice injected with a gadolinium chelate in the *cisterna magna*, we show that this pathway drives CSF circulation at a rate comparable to what observed earlier in the brain. Histology revealed that CSF drainage occurs concomitantly to the expression of AQP4 on astrocyte end feet. In experimental autoimmune encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis affecting primarily the spinal cord, perivascular CSF flux was reduced in the spinal cord but not in the brain or cerebellum. This alteration was associated to inflammatory cell accumulation within the perivascular space and AQP4 disorganisation and associated to a large increase in ventricle volume.

Introduction

The existence of a paravascular pathway draining cerebrospinal fluid (CSF) through the cerebral tissue has been originally described in the brain(Rennels *et al.*, 1985). The involvement of astroglial cells in its functioning later gave rise to the concept of "glymphatic" system(Iliff *et al.*, 2013). Briefly, the CSF enters the brain parenchyma *via* Virchow–Robin spaces, diffuses into the brain parenchyma and drains along the veins through perivascular tunnels formed by astrocyte end feet (Jessen *et al.*, 2015). The water channel Aquaporin 4 (AQP4), expressed in a polarized manner on these astrocyte end feet facilitates the CSF flux by providing a convective interstitial fluid flux(Iliff *et al.*, 2013). The existence of an intramural perivascular pathway is crucial for the brain physiology because it drives the draining of interstitial fluid and solutes from the parenchyma(Engelhardt *et al.*, 2016). Recent studies have shown an alteration of perivascular CSF flux during ageing and in several models of neurological diseases such as Alzheimer's Disease(Peng *et al.*, 2016) traumatic brain injury(Iliff *et al.*, 2014), vascular dementia(Venkat *et al.*, 2017), stroke(Gaberel *et al.*, 2014) or subarachnoid hemorrhage(Goulay *et al.*, 2017).

Surprisingly, no study has so far investigated whether a perivascular CSF flux comparable to what reported in the brain existed in the spinal cord parenchyma, despite the necessity of a drainage system in the spinal cord too. Moreover, this perivascular drainage system may be altered in neurological diseases like amyotrophic lateral sclerosis, spinal muscular atrophy or multiple sclerosis. In the present study, we developed an original method allowing to image the circulation of CSF through the mouse spinal cord using high resolution MRI in freely breathing mice. We give the evidence of a perivascular CSF drainage in the mouse spinal cord parenchyma, and show that it can be altered in the spinal cord of mice subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), a model of multiple sclerosis.

Results and discussion

The existence of a perivascular CSF flux can be evidenced by the minimally invasive injection of tracers in the *cisterna magna* (Iliff *et al.*, 2013; Gaberel *et al.*, 2014) and the observation of its apparent diffusion within cerebral tissues. Using this method, we observed by *ex-vivo* imaging the broad diffusion of indocyanine green within the spinal cord parenchyma after 1h (Figure 1A and corresponding quantification, Figure 1B). Our team previously reported that magnetic resonance imaging (MRI) can be used to follow the clearance of contrast agents *via* the perivascular CSF flux after their injection in the *cisterna magna*. One hour after injection of DOTA-Gd into the *cisterna magna*, we observed two types of T_1 hypersignal: first, a strong hypersignal at the border of the spinal cord (Figure 1C, yellow arrows), corresponding to the classically described arachnoid CSF flux (Rennels et al., 1985); second, a more diffuse hypersignal within the whole spinal cord parenchyma (Figure 1C, white arrows), which showed that the contrast agent had reached all spinal cord regions. This hypersignal then gradually decreased (4h and 24h, Figure 1D, and corresponding quantification, Figure 1E-F). These results indicate that a perivascular CSF flux drives the clearance of solutes from the spinal cord parenchyma at a rate comparable to what previously reported in the brain(Gaberel *et al.*, 2014). It has been estimated that the CSF is completely renewed four times by day(Sakka, Coll and Chazal, 2011) and our data indicate that the spinal cord perivascular CSF flux participates to this process.

The presence of AQP4 around the vessels is believed to play a role in the establishment of the perivascular CSF flux: by causing a polarized flux of water, AQP4 would cause a convective CSF flux between the astrocytic end-feet(Jessen *et al.*, 2015). In line with this hypothesis, astrocytic end-feet within the brain contain a 10-fold higher density of AQP4 than other membranes(Nagelhus *et al.*, 1998). Our next step was to confirm that AQP4 was displayed on astrocyte end feet surrounding spinal cord vessels, as previously reported in brain

vessels(Nielsen *et al.*, 1997). Immunostainings showed that AQP4 staining surrounds the vasculature of the spinal cord parenchyma (Figure 1G), in a manner comparable to what previously observed in the brain(Nielsen *et al.*, 1997).

Together, these data show that a perivascular CSF flux drives solute efflux from the spinal cord parenchyma via a pathway which shares functional and structural characteristics with the "glymphatic" system previously described in the brain(Iliff *et al.*, 2013).

Then, we investigated whether the spinal cord-wide fluid transport could be altered in case of spinal cord disease. Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) is a widely used model of multiple sclerosis which consists in the induction of an autoimmune response against myelin peptides, with a strong neuroinflammatory reaction within the spinal cord. Given the importance of CNS fluid drainage in inflammation and immune response to the CNS(Engelhardt, Vajkoczy and Weller, 2017), we addressed whether EAE is accompanied by a reduction of perivascular solute flux in the spinal cord parenchyma.

After injection into the *cisterna magna*, DOTA-Gd diffused within the spinal cord parenchyma of sham animals (as highlighted by T_1 hypersignal) (Figure 2A and corresponding quantification, Figure 2B) in the same manner as what observed in control animals (Figure 1D). In contrast, T_1 hypersignal was much lower in EAE animals (Figure 2A and corresponding quantification, Figure 2B), revealing a reduced diffusion of DOTA-Gd towards their spinal cord parenchyma. These data were confirmed by the *ex-vivo* observation that indocyanine green diffused less through the spinal cord parenchyma of EAE animals than in sham animals (Figure 2C and corresponding quantification, Figure 2D). Noteworthy, the diffusion of DOTA-Gd (Figure 2E and corresponding quantification, Figure 2F) and indocyanin green (Figure 2G and corresponding quantification, Figure 2H) were normal in the brain and cerebellum of these animals. These data show that during EAE, a severe alteration of the perivascular CSF flux occurs in the spinal cord. A striking fact is that this alteration is restricted to the spinal cord,

with no measurable modification in the brain or cerebellum. These data are very much in accordance with previous observations that EAE triggers the spinal cord much more severely than the brain and the cerebellum(Fournier *et al.*, 2017).

Disorganisation of AQP4 expression on astrocytes end feet is believed to participate in the reduction of the perivascular CSF flux previously observed in the ageing(Kress *et al.*, 2014) or degenerating(Peng *et al.*, 2016) brain. We show here that in the spinal cord of EAE animals AQP4 expression is dramatically disorganised: it is translocated from a perivascular location to a widespread parenchymal expression (Figure 2I). We propose that this disorganization of the AQP4 system in the spinal cord of EAE animals could drive, at least in part, the disruption of the perivascular CSF flux. Noteworthy, this process was not observed in the brain (Figure S1) or cerebellum (data not shown), which matches the above observation that the dysfunction of the perivascular CSF flux occurs preferentially in the spinal cord, and not in the brain (Figure 2).

We then asked in what extent the disruption of the perivascular CSF flux in the spinal cord could participate in EAE physiopathology. Noteworthy, we observed that lymphocyte infiltration occurs preferentially in the spinal cord, with little if any infiltration in the brain and cerebellum (Figure 2J). This indicates that, in EAE, lymphocyte infiltration occurs preferentially in the region of the CNS where the perivascular CSF flux is altered, i.e. the spinal cord. This observation leads us to formulate two opposite hypotheses: On the one hand, the dysfunction of the perivascular CSF flux pathway could facilitate immune infiltration, which would make it a cause rather than a consequence of EAE. Nevertheless, this pathway was not altered in pre-symptomatic animals (Figure 3A and corresponding quantification, Figure 3B), which stands against an early involvement of perivascular CSF flux pathway dysfunction in the onset of EAE. On the other hand, the dysfunction of this pathway could result from immune infiltration, which would make it a consequence rather than a cause of EAE. A possible

explanation would be that immune cell infiltration together with blood-spinal cord barrier dysfunction occurring during the early phases of EAE(Fournier *et al.*, 2017) would drive the detachment of astrocytic end-feet, thus leading to AQP4 translocation and dysfunction of the perivascular CSF flux pathway. Indeed, AQP4 disorganisation was observed at the vicinity of perivascular infiltrates only in late EAE lesions, but not in early lesions (Figure 3C). Inflammatory cells invaded the space between the basal lamina and perivascular astrocyte end-feet (Figure 3C). This perivascular location is very likely to interfere with perivascular CSF fluxand were identified as lymphocytes (Figure 3D). Interestingly, the ability of these lymphocytes to cross the *glia limitans* is critical for the development of the disease(Agrawal *et al.*, 2006; Flach *et al.*, 2016). Finally, because the impairment of perivascular CSF flow may profoundly impair fluid drainage in the whole CNS, we investigated whether the ventricular size may be modified in EAE animals. Strikingly, ventricles (lateral, third and fourth ventricles) were twice larger in EAE animals as compared to sham animals (Figure 4). These data complement the previous observation of an overall increase of ventricle volume in the same multiple sclerosis model(Aharoni *et al.*, 2013).

The present study gives the first description of a disruption of the perivascular CSF flux in animal models of EAE and should open a new field of investigation with a potential interest for the management of multiple sclerosis. Indeed, our study suggests that detection of perivascular CSF flux impairment could be used for diagnostic purposes. The opportunity of this approach is reinforced by current investigations giving the basis for non-invasive imaging of perivascular CSF flux pathway.

MATERIAL AND METHODS:

Animals: Experiments were performed on female SJL/J mice (Janvier, Le Genest-Saint-Isle, France) in accordance with the French (Decree 87/848) and the European Communities Council (Directive 86/609) guidelines. This study and the procedures thereof were approved by the French ministry of education and research (Project #02654.02; Center agreement #D14118001). All animals of this study were maintained under specific pathogen-free conditions at the Centre Universitaire de Ressources Biologiques (CURB, Basse-Normandie, France).

Intracisternal injection : Specific tracers (indocyanine green or Dotarem) were injected (1 µL over 1 minute) into the *cisterna magna* following a previously reported method(Gaberel *et al.*, 2014) (Gaberel et al., 2014) by using a pulled glass micropipette (diameter=~80 µm).

Experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE): *Relapsing remitting EAE (PLP-induced EAE)* mice and sham animals was induced in 6/8-week-old female SJL/J mice following a previously reported method (Fournier et al., 2017).

MRI experiments: MRI was performed on a 7T Pharmascan MRI system (Bruker, Germany) equipped with surface coils. High-resolution 3D T_1-weighted imaging of the brain was performed with a Fast Low Angle Shot (FLASH) sequence with the following parameters: TR/TE 15/3.57 ms, Angle= 25°, Field of View= 20*17*14.4 mm, Matrix= 256*218*96 (leading to a resolution of 78*78*0.15 mm), acquisition time= 5m 14s. High-resolution 2D T_1-weighted imaging of the spinal cord was performed with the following parameters sequence set as follow : TR/TE 16.4/3.393 ms, Angle=40°, Field of View=20*15 mm, Matrix =256*192, Slice Thickness : 0.4 mm, acquisition time= 2m 37s. Quantification of the images was performed using ImageJ (1.48, NIH) in a blinded manner.

***Ex vivo* optical imaging:** 1h after intracisternal indocyanine green microinjection, brain and spinal cords were removed and studied with an optical imaging system (Biospace). Fluorescence is measured (excitation= 650 nm, background= 500nm, emission filter= 700nm) and quantified with the M3 Vision software (Biospace).

Immunohistochemistry: Euthanasia,tissue preparation and immuostaining was performed as described earlier(Fournier *et al.*, 2017) (Fournier et al., 2017). Following antibodies has been used: goat anti- Collagen IV (1:1000; SouthernBiotech), rabbit anti-Aquaporine 4 (1:1000; Santa Cruz Biotechnology), rat anti-CD4 (1:25; ebioscience) and sheep anti-fibrinogen (1:10000). Primary antibodies were revealed using Fab'2 fragments of Donkey antirat, rabbit or goat IgG linked to FITC, TRITC (1:600, Jackson ImmunoResearch, West Grove, USA). Images were digitally captured using a Leica DM6000 microscope-coupled coolsnap camera,visualized with Metavue 5.0 software (Molecular Devices, USA) and further processed using ImageJ 1.49e software (NIH). All analyses were performed blinded to the experimental data.

Statistical analysis: Results are presented as the mean ± SEM. Normality tests were performed on all samples (D'Agostino-Pearson omnibus test and Shapiro-Wilk test). When normality could not be assumed, we used non-parametric tests (Kruskal-Wallis for multiple comparisons followed by Mann-Whitney's U-test), which are the most stringent in these conditions. Two groups were considered to be significantly different when p-value < 0.05.

1. Rennels, M. L., Gregory, T. F., Blaumanis, O. R., Fujimoto, K. & Grady, P. A. Evidence for a 'paravascular' fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space. *Brain Res.* **326,** 47–63 (1985).

2. Iliff, J. J. *et al.* Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI. *J. Clin. Invest.* **123,** 1299–1309 (2013).

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

4. Engelhardt, B. *et al.* Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **132,** 317–338 (2016).

5. Peng, W. *et al.* Suppression of glymphatic fluid transport in a mouse model of Alzheimer's disease. *Neurobiol. Dis.* **93,** 215–225 (2016).

6. Iliff, J. J. *et al.* Impairment of glymphatic pathway function promotes tau pathology after traumatic brain injury. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **34,** 16180–16193 (2014).

7. Venkat, P. *et al.* White matter damage and glymphatic dysfunction in a model of vascular dementia in rats with no prior vascular pathologies. *Neurobiol. Aging* **50,** 96–106 (2017).

8. Gaberel, T. *et al.* Impaired glymphatic perfusion after strokes revealed by contrast-enhanced MRI: a new target for fibrinolysis? *Stroke* **45,** 3092–3096 (2014).

9. Goulay, R. *et al.* Subarachnoid Hemorrhage Severely Impairs Brain Parenchymal Cerebrospinal Fluid Circulation in Nonhuman Primate. *Stroke* (2017). doi:10.1161/STROKEAHA.117.017014

10. Sakka, L., Coll, G. & Chazal, J. Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid. *Eur. Ann. Otorhinolaryngol. Head Neck Dis.* **128,** 309–316 (2011).

11. Nagelhus, E. A. *et al.* Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **18,** 2506–2519 (1998).

12. Nielsen, S. *et al.* Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain. *J. Neurosci. Off. J. Soc. Neurosci.* **17,** 171–180 (1997).

13. Engelhardt, B., Vajkoczy, P. & Weller, R. O. The movers and shapers in immune privilege of the CNS. *Nat. Immunol.* **18,** 123–131 (2017).

14. Fournier, A. P. *et al.* Prediction of disease activity in models of multiple sclerosis by molecular magnetic resonance imaging of P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114,** 6116–6121 (2017).

15. Kress, B. T. *et al.* Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain. *Ann. Neurol.* **76,** 845–861 (2014).

16. Flach, A.-C. *et al.* Autoantibody-boosted T-cell reactivation in the target organ triggers manifestation of autoimmune CNS disease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113,** 3323–3328 (2016).

17. Agrawal, S. *et al.* Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Exp. Med.* **203,** 1007–1019 (2006).

18. Aharoni, R. *et al.* Magnetic resonance imaging characterization of different experimental autoimmune encephalomyelitis models and the therapeutic effect of glatiramer acetate. *Exp. Neurol.* **240,** 130–144 (2013).

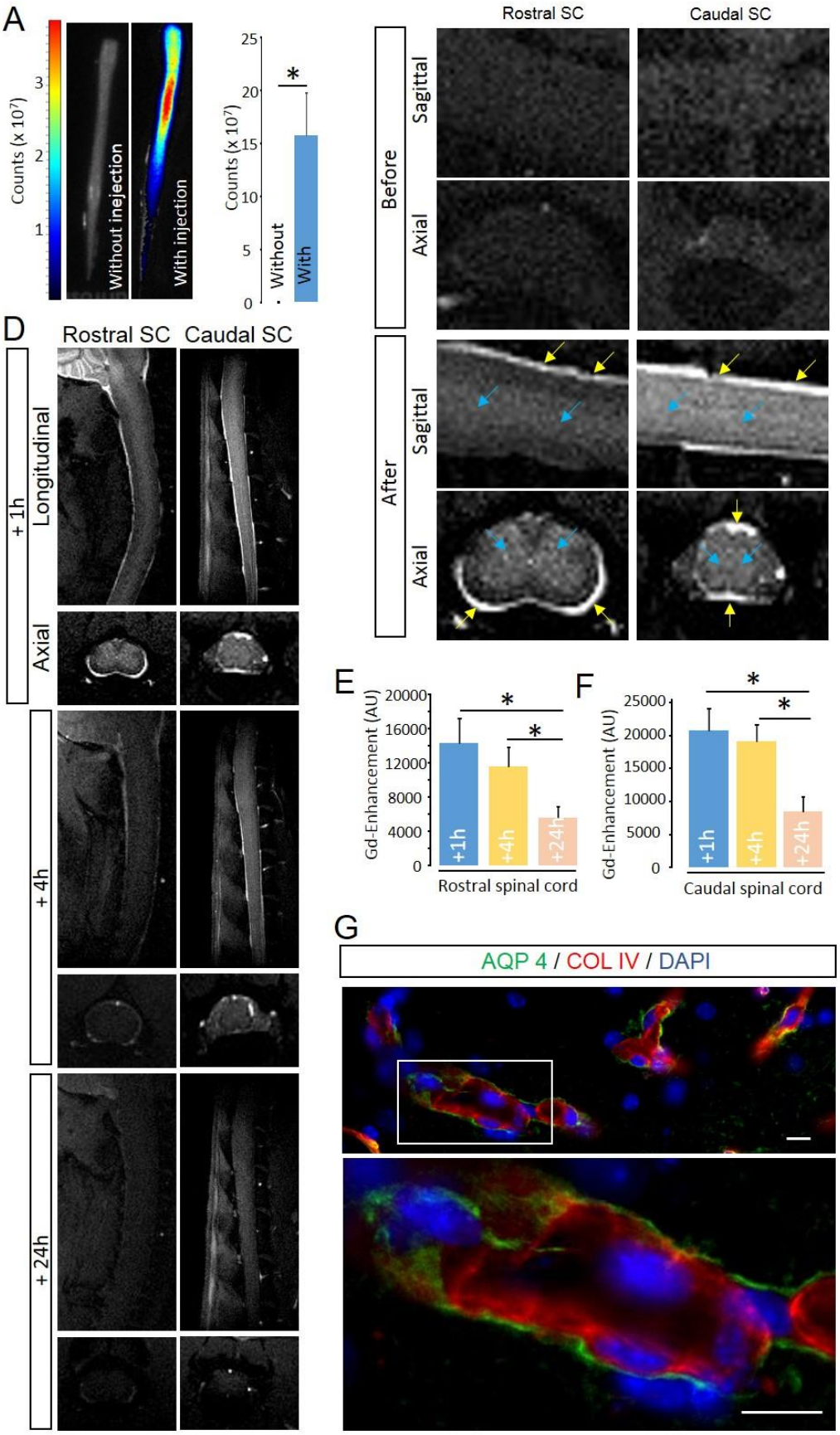
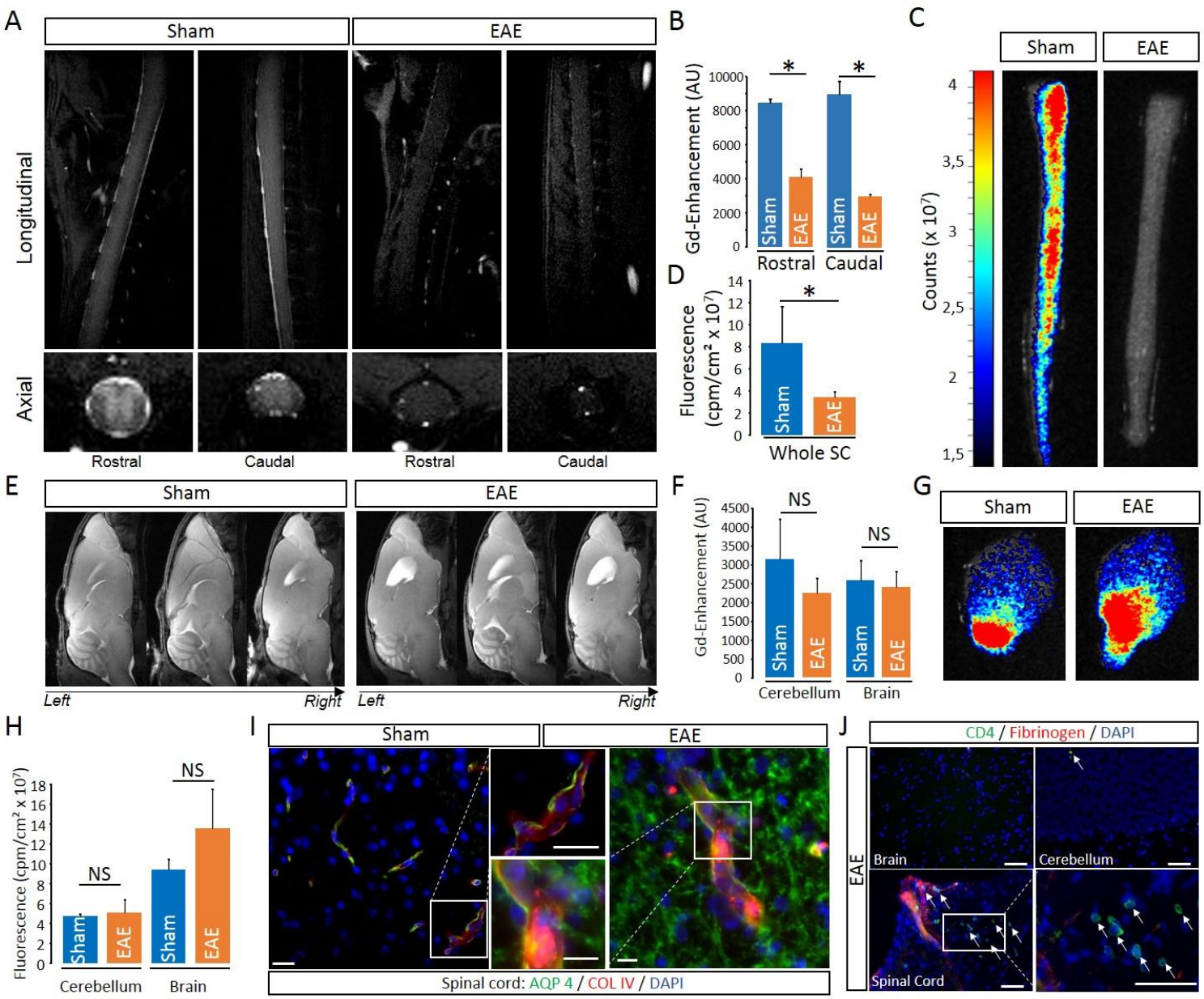

A
Counts (x 10⁷)
Without injection
With injection
Counts (x 10⁷)
Without
With
*
Rostral SC
Caudal SC
Before
Sagittal
Axial
After
Sagittal
Axial
D
Rostral SC
Caudal SC
+ 1h
Longitudinal
Axial
+ 4h
+ 24h
E
Gd-Enhancement (AU)
+1h
+4h
+24h
Rostral spinal cord
F
Gd-Enhancement (AU)
+1h
+4h
+24h
Caudal spinal cord
G
AQP 4 / COL IV / DAPI

Figure 1

Figure 1: Spinal cord-wide pathway for fluid transport in the spinal cord. (A) *Ex-vivo* optical imaging shows Indocyanine green perivascular influx into the spinal cord parenchyma. **(B)** Quantification of fluorescence in spinal cord tissues revealed Indocyanine green diffusion though the spinal cord parenchyma (n=3-6; $p<0.05$). **(C)** Representative axial and sagittal T1-weighted images before and after DOTA-Gd injection in the *cisterna magna*, showing the arachnoid CSF flux (yellow arrows) and the parenchymal influx (blue arrows). **(D)** Representative axial and sagittal T1-weighted images after DOTA-Gd injection at indicated times (+1h; +4h; +24h). **(E)** Corresponding signal void quantification of the rostral spinal cord (n=4 /group; *$P<0.05$). **(F)** Corresponding signal void quantification of the caudal spinal cord (n=4 /group; *$P<0.05$). **(G)** Immunohistological images ofAQP4 distribution in the mice spinal cord with a low magnification (upper panel) and a high magnification (lower panel)by Green: AQP4; red: collagen IV, blue: cell nuclei, AQP4: aquaporine 4). Scale bar = 10µm.



<u>Figure 2:</u> CSF influx into the spinal cord is reduced in a mouse model of multiple sclerosis. **(A)** Representative axial and sagittal T1-weighted images with DOTA-Gd injection in the *cisterna magna*, showing a lower perivascular influx of the contrast agent in the EAE spinal cord compared to sham. **(B)** Corresponding quantification for rostral and caudal spinal cord of EAE and sham mice (n=3-4 /group; *P<0.05) **(C)** Representative e*x vivo* optical imaging of the spinal cord after indocyanine green injection in the *cisterna magna* of EAE and sham mice. **(D)** Corresponding quantification of fluorescence (n=3-4 /group; *P<0.05). **(E)** Representative

sagittal T1-weighted images of the brain showing a similar perivascular influx of the contrast agent in EAE mice compared to sham mice. **(F)** Corresponding quantification for cerebellum and brain of EAE and sham mice (n=3-4 /group). **(G)** Representative e*x vivo* optical imaging of the wholebrain after indocyanine green injection in the *cisterna magna* of EAE and sham mice. **(H)** Corresponding quantification of fluorescence in cerebellum and brain of EAE and sham mice (n=3-4 /group). **(I)** Representative immunohistological images of the AQP4 (green) distribution in EAE and sham spinal cord (Red: collagen IV; Blue: cell nuclei, AQP4: aquaporine 4). Scale bar = 10µm. **(J)** Representative immunohistological images of the CD4 cells infiltration (green) and fibrinogen extravasation (red) of the PLP-induced EAE CNS (Blue: cell nuclei). Scale bar = 50µm.

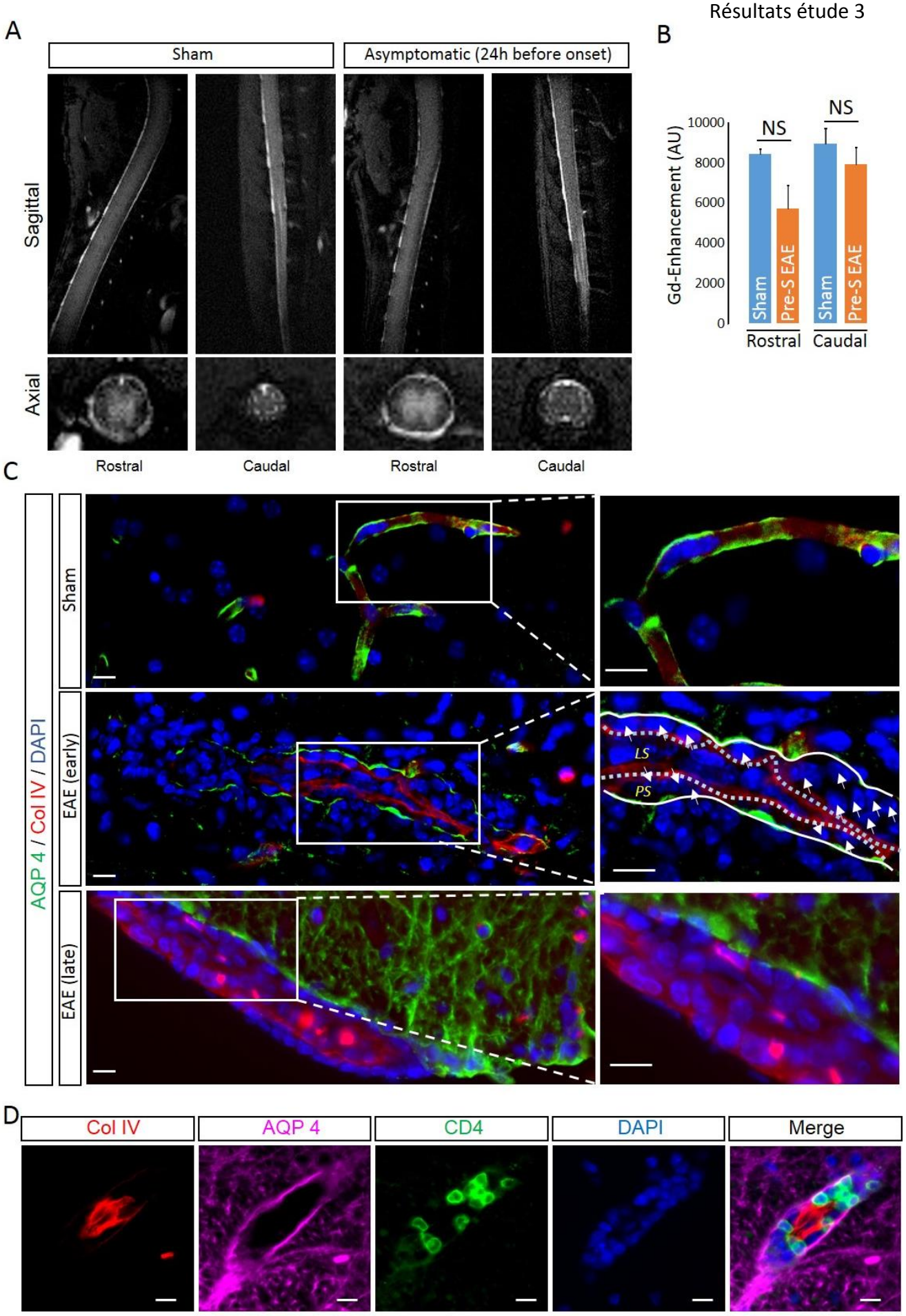
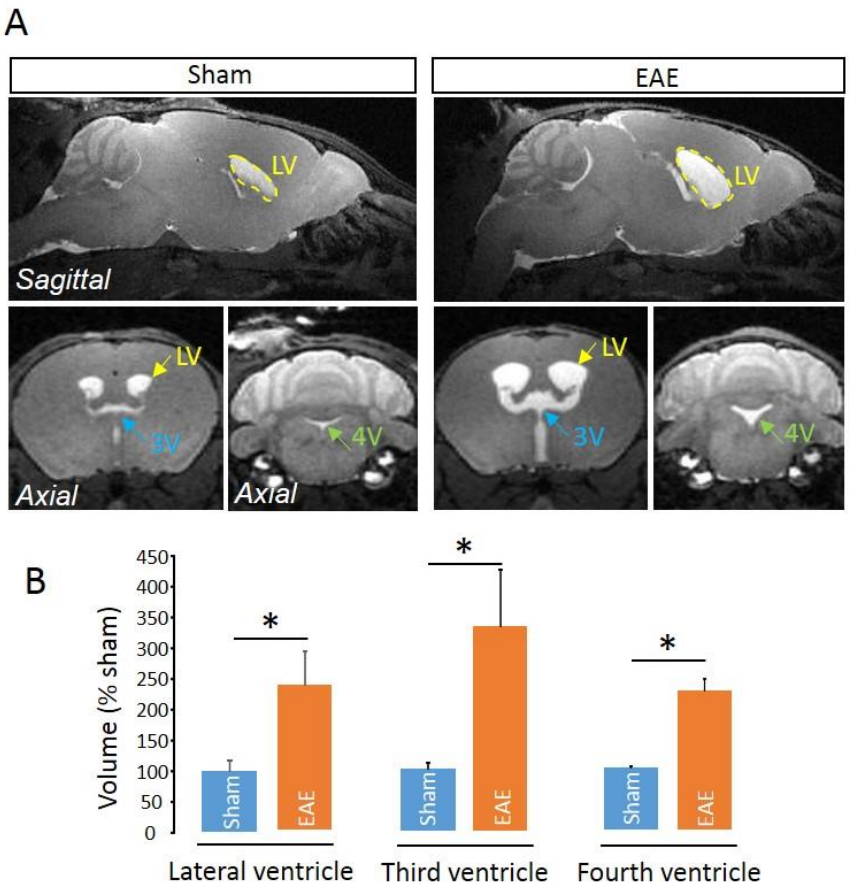
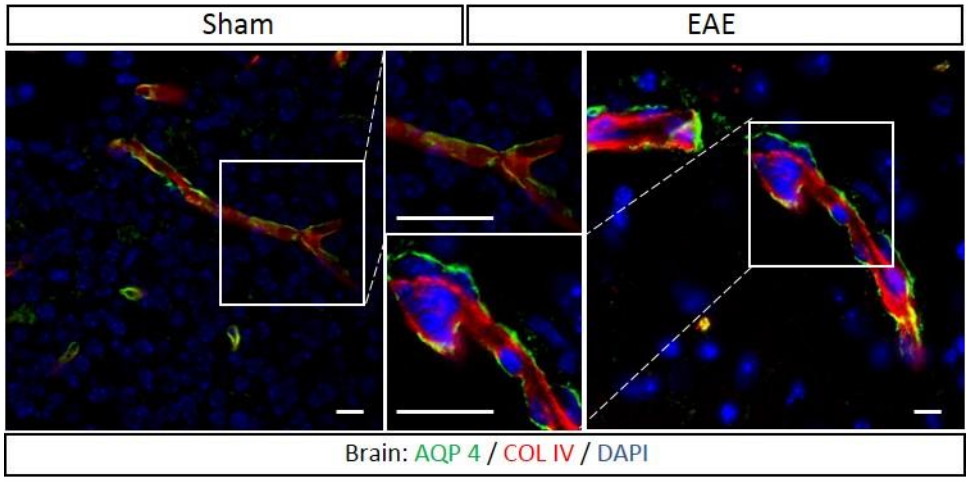

A
Sham
Asymptomatic (24h before onset)
Sagittal
Axial
Rostral
Caudal
Rostral
Caudal
B
Gd-Enhancement (AU)
10000
8000
6000
4000
2000
0
NS
NS
Sham
Pre-S EAE
Sham
Pre-S EAE
Rostral
Caudal
C
AQP 4 / Col IV / DAPI
Sham
EAE (early)
EAE (late)
LS
PS
D
Col IV
AQP 4
CD4
DAPI
Merge

Figure 3

<u>Figure 3</u>: Perivascular CSF flux pathway is not altered in pre-symptomatic animals. (A) Representative axial and sagittal T1-weighted images with DOTA-Gd injection in the *cisterna magna*, showing a similar perivascular influx of the contrast agent in the spinal cord of asymptomatic EAE (24h before onset) compared to sham at the same time. **(B)** Corresponding quantification for rostral and caudal spinal cord (n=4 /group). **(C)** Representative immunohistological images of the vessels with a low magnification (left panel) and a high magnification (right panel) of EAE mice at different stage of the disease and sham animals. (LS: luminal side; PS: previascular space; green: AQP4, red: collagen IV; blue: cell nuclei, AQP4: aquaporine 4) Scale bar= 10µm. (D) Representative immunohistological images of CD4 lymphocytes accumulate in the perivascular spaces in EAE animals (red: collagen IV; magenta: AQP4; green: CD4; blue: cell nuclei, AQP4: aquaporine 4). Scale bar= 10µm.



<u>Figure 4:</u> In vivo assessment of ventricle enlargement in EAE mice. (A) Axial T1-weighted brain images from EAE and sham mice at the level of the lateral ventricle (LV), third ventricle (3V) and fourth ventricle (4V). **(B)** Corresponding quantification of ventricle size (n=4 /group; *P<0.05).



<u>Figure S1:</u> Organisation of AQP4 expression in Brain of EAE mice. Representative immunohistological images of the AQP4 distribution in EAE and sham brain (green: AQP4; red: collagen IV; blue: cell nuclei, AQP4: aquaporine 4). Scale bar = 10µm.

DISCUSSION

Les outils actuellement disponibles en clinique peinent à diagnostiquer précocement la SEP. Ainsi, le diagnostic de la SEP peut parfois prendre plusieurs années. De nouvelles stratégies pour détecter l'activité de la SEP sont donc recherchées pour améliorer le diagnostic et le suivi des patients. Aujourd'hui, alors que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) est largement utilisée pour diagnostiquer et suivre l'évolution de la SEP, aucun outil d'imagerie ne permet de prédire l'évolution de la maladie et l'efficacité des stratégies thérapeutiques.

Dans la première étude de cette thèse, nous montrons que l'IRM moléculaire ciblant la molécule d'adhésion endothéliale P-sélectine démasque les événements pathologiques qui se produisent dans le SNC de souris soumises à différents modèles de SEP. Cette approche fournit un suivi spatiotemporel quantitatif de l'évolution de la maladie. De plus, elle prédit l'apparition d'une rechute chez des souris asymptomatiques ou d'une rémission chez des souris symptomatiques. Cette étude suggère que l'IRM moléculaire ciblant la P-sélectine pourrait permettre d'améliorer le diagnostic, le suivi du traitement et la gestion des cycles de poussées et de rémissions chez les patients atteints de SEP en fournissant des informations actuellement inaccessibles aux techniques conventionnelles d'IRM. L'imagerie de la P-sélectine développée dans ce projet a fait l'objet d'un article publié dans le journal *Proceeding of the National Academy of Science of the United States of America (PNAS)* et d'un dépôt de brevet Européen (n°EP16305132.9).

La deuxième partie de cette thèse concerne l'adaptation de l'imagerie moléculaire à la détection de l'inflammation intestinale dans des modèles animaux de SEP. En effet, la littérature scientifique suggère qu'il existe de nombreux liens entre les pathologies inflammatoires de l'intestin et la SEP. En accord avec cela, cette étude montre que l'IRM moléculaire ciblant la molécule d'adhésion intestinale MAdCAM-1 démasque une importante inflammation intestinale durant les poussées d'un modèle animal de SEP récurrente-rémittente. Cette étude pourrait aider à prendre en compte la gestion de l'inflammation dans les soins aux patients atteints de SEP et apporter de nouvelles avancées dans le diagnostic et le pronostic des poussées de SEP en ciblant l'inflammation intestinale.

La troisième partie de cette thèse concerne l'étude de la circulation de LCR dans le tissu du SNC (concept de système glymphatique). Grâce à l'utilisation de techniques d'imagerie *in vivo* et *ex vivo*, nous avons pu mettre en évidence l'existence d'un tel flux dans le parenchyme de la moelle épinière, ainsi que son altération dans un modèle de SEP. Cette

altération pourrait avoir des implications importantes dans la physiopathologie de cette maladie.

Les résultats et les perspectives des différentes études sont exposés et discutés si dessous.

1. L'IRM moléculaire de la P-sélectine

Cette étude rapporte le développement d'une méthode innovante d'imagerie moléculaire pour la détection de l'inflammation dans le SNC de souris. En ciblant la P-sélectine et en utilisant des séquences d'IRM adaptées à l'imagerie de la moelle épinière, nous avons réalisé un suivi diagnostique des animaux soumis à une EAE chronique ou récurrente-rémittente. Cette étude montre la validité de l'imagerie moléculaire visant la P-sélectine pour le suivi de la maladie et la prédiction de rechutes ou rémissions chez les souris soumises à des modèles animaux de SEP.

Vers un diagnostic amélioré ?

Aujourd'hui, le diagnostic de la SEP est basé sur la recherche d'une dissémination spatiale et temporelle des plaques de démyélinisation. Grâce à l'utilisation du Gadolinium, les neurologues peuvent déterminer si une plaque est associée ou non à une altération de la BHE, et ainsi déterminer si cette dernière est encore active. Cependant, une plaque active ne présente pas toujours d'altération de la BHE. Inversement, une altération de la BHE ne semble pas toujours associée à une infiltration de cellules immunitaires et à une démyélinisation (Ladewig *et al.*, 2009; Weise and Stoll, 2012). Ainsi, l'utilisation de l'IRM moléculaire pourrait améliorer le diagnostic en permettant de déterminer l'activité des plaques dépourvues d'altération de la BHE. En disposant d'une telle technique d'IRM en clinique, les neurologues pourraient avoir accès à la principale donnée actuellement manquante dans le diagnostic de la SEP qu'est la détection et la mesure du niveau d'activation vasculaire. De plus, l'effet prédictif que nous observons chez l'animal nous pourrait permettre d'observer une zone d'infiltration avant même qu'elle ne soit touchée par la démyélinisation (substance blanche d'apparence normale, décrite dans la littérature sous le terme de *normal appearing white matter*) et donc avant même que cette zone ne soit visible avec l'IRM conventionnelle.

En plus d'aider au diagnostic de la SEP, l'imagerie moléculaire de la P-sélectine pourrait aider les neurologues dans le suivi de la réponse aux traitements des patients. En effet, une diminution de signal entre deux examens d'IRM moléculaire permettrait d'affirmer de façon objective que le patient répond bien au traitement en cours. À l'inverse, cette technique pourrait également permettre une meilleure réactivité pour un éventuel changement de traitement si celui-ci s'avère inefficace. De plus, l'effet prédictif de cette technique pour l'apparition des rechutes permettrait de traiter les patients plus tôt.

Bench to bedside

La principale limitation de la translation de cette technique à la clinique réside dans le fait que les MPIOs utilisées dans cette étude ne sont pas biodégradables. Ces dernières s'accumulent de manière non spécifique et définitive dans le foie. Bien que cette accumulation ne modifie pas l'évolution de la maladie, le développement d'un agent de contraste biodégradable est nécessaire pour envisager une utilisation chez l'Homme. Le récent développement de nouvelles générations de MPIOs biodégradables compatibles avec l'IRM moléculaire permet cependant d'envisager une application prochaine vers la clinique (Perez-Balderas *et al.*, 2017).

L'utilisation d'autres techniques d'imagerie peu invasives pourrait permettre de contourner l'utilisation des MPIOs non-biodégradables. Par exemple, l'utilisation de la tomographie par émission de positrons (TEP) permettrait de s'affranchir de l'injection de MPIOs en les remplaçant par un traceur radioactif couplé à un anticorps anti-P-sélectine. Ce type d'imagerie est aujourd'hui d'autant plus intéressant que la pauvre résolution spatiale de la TEP peut être compensée par l'utilisation de l'imagerie TEP-IRM, permettant d'allier les données morphologiques de l'IRM ainsi que les données métaboliques et fonctionnelles de la TEP. Cependant, la validité de l'utilisation de la TEP pour la détection de l'expression de molécules d'adhésion nécessiterait l'utilisation d'un traceur radioactif à courte demi-vie plasmatique et ne pouvant pas traverser la BHE altérée.

Quelques heures après leur fixation sur la paroi des vaisseaux, les MPIOs se décrochent, dans nos études chez l'animal, ce qui permettrait d'envisager la répétition de l'examen sur le même sujet. Cependant, les liaisons d'un anticorps sur son antigène sont souvent de forte affinité, ce qui laisse penser que ce ne sont pas les MPIOs qui se décrochent de la P-sélectine

mais bien le complexe P-sélectine-MPIOs qui est libéré par les cellules endothéliales. En accord avec cette idée, il a été montré que la quantité de P-sélectine soluble dans le plasma des patients atteints de SEP est augmentée pendant les poussées (Kuenz *et al.*, 2005). Il serait intéressant de déterminer, *via* des prélèvements sanguins, si une telle augmentation de la P-sélectine chez les patients asymptomatiques est prédictive de l'apparition d'une poussée.

Caractérisation d'une dissémination spatiale et temporelle

Dans cette étude, nous montrons dans la modèle d'EAE chronique induit par la MOG, que le signal induit par la fixation des MPIOs-αP-sélectine suit la même dissémination spatiale et temporelle que l'infiltration des lymphocytes. Or, l'infiltration des leucocytes ne dépend pas seulement du niveau d'expression des molécules d'adhésion, mais également de l'importance des contraintes de cisaillement (correspondant aux frottements exercés par le flux sanguin sur la paroi des vaisseaux). En effet, le niveau d'infiltration est inversement corrélé avec les contraintes de cisaillement (Xu *et al.*, 2003). Tout laisse à penser qu'il en est de même pour la fixation des MPIOs : plus ces contraintes sont importantes, moins ces dernières seraient aptes à fixer la paroi vasculaire. Ainsi, la bonne capacité des MPIOs-αP-sélectine à révéler l'infiltration lymphocytaire semble due au fait que les éléments qui influent sur leur fixation influencent également l'infiltration leucocytaire.

L'IRM moléculaire de la P-sélectine dévoile un gradient caudo-rostral de l'activation vasculaire dans la moelle épinière des souris atteintes d'EAE progressive. En effet, l'activation vasculaire touche seulement la partie caudale de la moelle épinière au début de la maladie, et s'étend pour atteindre également la partie supérieure de la moelle épinière au pic de la maladie. Cette observation est confirmée par une dissémination spatio-temporelle semblable de l'altération de la barrière hémato-spinale et de l'infiltration lymphocytaire. Nos observations sur les animaux atteints d'EAE récurrente-rémittente laissent penser que la même dissémination spatiale des évènements pathologiques se produit dans la moelle épinière de ce modèle, mais de manière plus rapide (la moelle épinière étant entièrement touchée dès le score clinique 2). Plusieurs hypothèses peuvent expliquer l'origine de cette dissémination particulière. En effet, il semblerait que la barrière hémato-spinale soit plus perméable dans la moelle épinière caudale que dans la moelle épinière rostrale (Prockop LD, Naidu KA, Binard JE, 1995). Cette perméabilité accrue pourrait faciliter l'infiltration des cytokines et des cellules immunitaires dans les régions caudales. De plus, le débit sanguin

semble plus faible dans la moelle épinière lombaire que dans la moelle épinière cervicale (Duhamel *et al.*, 2009). Ce débit plus faible pourrait réduire les contraintes de cisaillement et ainsi faciliter l'infiltration des cellules immunitaires dans la partie caudale de la moelle épinière.

Cette étude montre que l'infiltration des lymphocytes a lieu majoritairement dans la substance blanche. En accord avec cela, les MPIOs-αP-sélectine se fixent préférentiellement dans cette dernière. Cependant, comme l'activation du système immunitaire dans l'EAE est périphérique (immunisation contre les peptides de myéline), il est en effet intrigant que l'infiltration ne touche pas toutes les régions du SNC. Cette question fait l'objet de nombreuses recherches dans la communauté scientifique. Il existe plusieurs explications possibles, comme le fait que les cellules endothéliales de la BHE soient capables d'internaliser des peptides de myéline pour ensuite les présenter aux LT circulants (Galea *et al.*, 2007; Lopes Pinheiro *et al.*, 2016). Ainsi, les cellules endothéliales de la substance blanche seraient plus aptes à recruter les LT activés contre un peptide de myéline. Une deuxième explication possible est qu'une première vague discrète d'infiltration ait lieu de manière diffuse dans toutes les régions du SNC, entraînant par la suite le recrutement d'une seconde vague plus importante et agressive dans la substance blanche.

Perspectives

Cette étude ouvre de nombreuses autres perspectives. Comme décrit précédemment, les PC seraient la porte d'entrée des premiers lymphocytes dans l'EAE (cf introduction, chapitre 2.4.4). Plusieurs de nos résultats préliminaires laissent penser que cette technique d'IRM moléculaire pourrait ainsi permettre de détecter une activation vasculaire des PC de manière plus précoce que celle ayant lieu dans la moelle épinière. A l'aide de l'immunohistochimie, nous montrons que la P-sélectine, qui n'est pas détectée en condition contrôle, est détectée dans le stroma des PC deux jours avant la date d'apparition moyenne des premiers symptômes. Au contraire, VCAM-1 est détectée de manière constitutive dans les PC, empêchant ainsi son utilisation comme marqueur d'activité de la maladie. Enfin, ICAM-1 semble exprimée préférentiellement sur la partie apicale des cellules épithéliales (coté LCR), rendant sa détection impossible avec une injection i.v. des MPIOs (figure 21). Ces résultats sont en accord avec la littérature, qui montre que l'infiltration des leucocytes à travers les PC

dépend de la P-sélectine (Kivisakk *et al.*, 2003; Ransohoff and Engelhardt, 2012; Strazielle *et al.*, 2016).

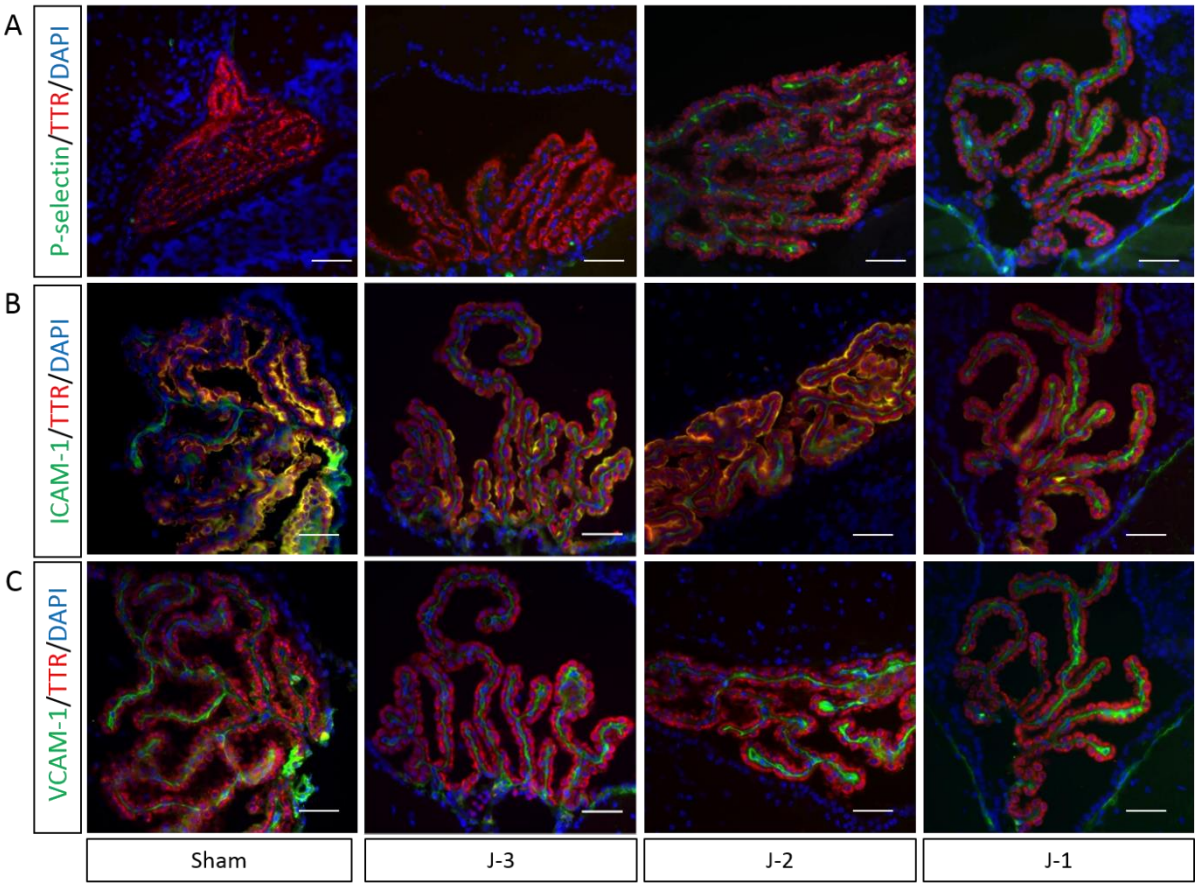


Figure 21 : Figure 20 : La P-sélectine est une cible de choix pour détecter l'activation des cellules endothéliales des PC dans l'EAE. (A) L'expression de la P-sélectine (marquée en vert) dans les PC (dont les cellules épithéliales sont marquées en rouge ; TTR= transthyrétine) commence deux jours avant la date d'apparition moyenne des premiers symptômes de l'EAE. (B) L'expression de ICAM-1 (vert) se produit sur les cellules épithéliales des PC (marquées en rouge). (C) VCAM-1 (vert) est exprimée de façon constitutive dans le stroma des PC. (n=3/condition).

Ainsi, grâce à son expression dans les PC, la P-sélectine serait un bon marqueur précoce d'activité de la maladie. La détection de l'expression de la P-sélectine dans les PC grâce à l'IRM moléculaire serait d'autant plus intéressante que la fenestration des vaisseaux des PC ne permet pas son étude avec l'injection de gadolinium. Nos résultats préliminaires utilisant l'IRM moléculaire montrent que l'activation des PC se produit bien deux jours avant l'apparition des

premiers symptômes, et donc au moins un jour avant l'activation vasculaire du parenchyme de la moelle épinière et du cerveau/cervelet (figure 22).

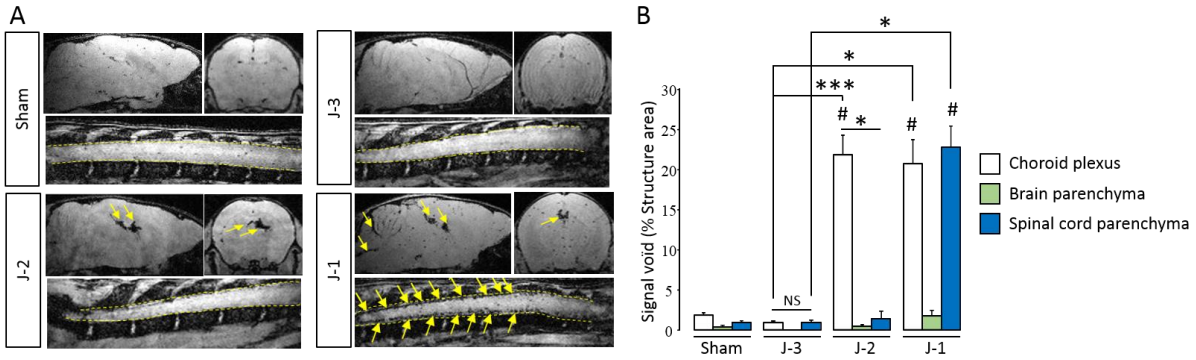


Figure 22 : L'IRM moléculaire de la P-sélectine révèle une activation des PC deux jours avant l'apparition de l'EAE. (A) Images représentatives de l'IRM moléculaire de la P-sélectine en condition contrôle, et chez des animaux EAE, trois, deux et un jour avant l'apparition des premiers symptômes. (B) La quantification du signal confirme l'activation précoce des PC, précédant celle de la moelle épinière et du cerveau (n=3-5/condition, #p<0.05 par rapport à la même structure du groupe sham ; *p<0.05 ; ***p<0.001).

Notre hypothèse est la suivante : après l'immunisation de l'animal contre un peptide de myéline, les cellules dendritiques présentent ce peptide aux cellules T dans les organes lymphoïdes. C'est l'immunité adaptative. Ceci va conduire au déploiement dans la circulation sanguine de cellules T mémoire. Les PC étant un lieu de surveillance immunitaire de routine, ces cellules T vont s'y infiltrer, et être réactivées par les CPA présentent dans les PC (CPA qui sont en contact constant avec les peptides de myéline présents dans le LCR). Comme le montrent nos immunohistochimies, des molécules d'adhésion, comme ICAM-1, sont présentes sur la paroi des PC afin que les cellules immunitaires puissent y adhérer (figure 20 B). Grâce au flux de LCR, les cellules immunitaires vont pouvoir se déplacer rapidement jusqu'à la moelle épinière pour y activer les cellules endothéliales, et entraîner le recrutement d'une seconde vague plus agressive d'infiltration. Cette seconde vague agressive provoquerait la démyélinisation à l'origine des symptômes de la SEP (figure 23).

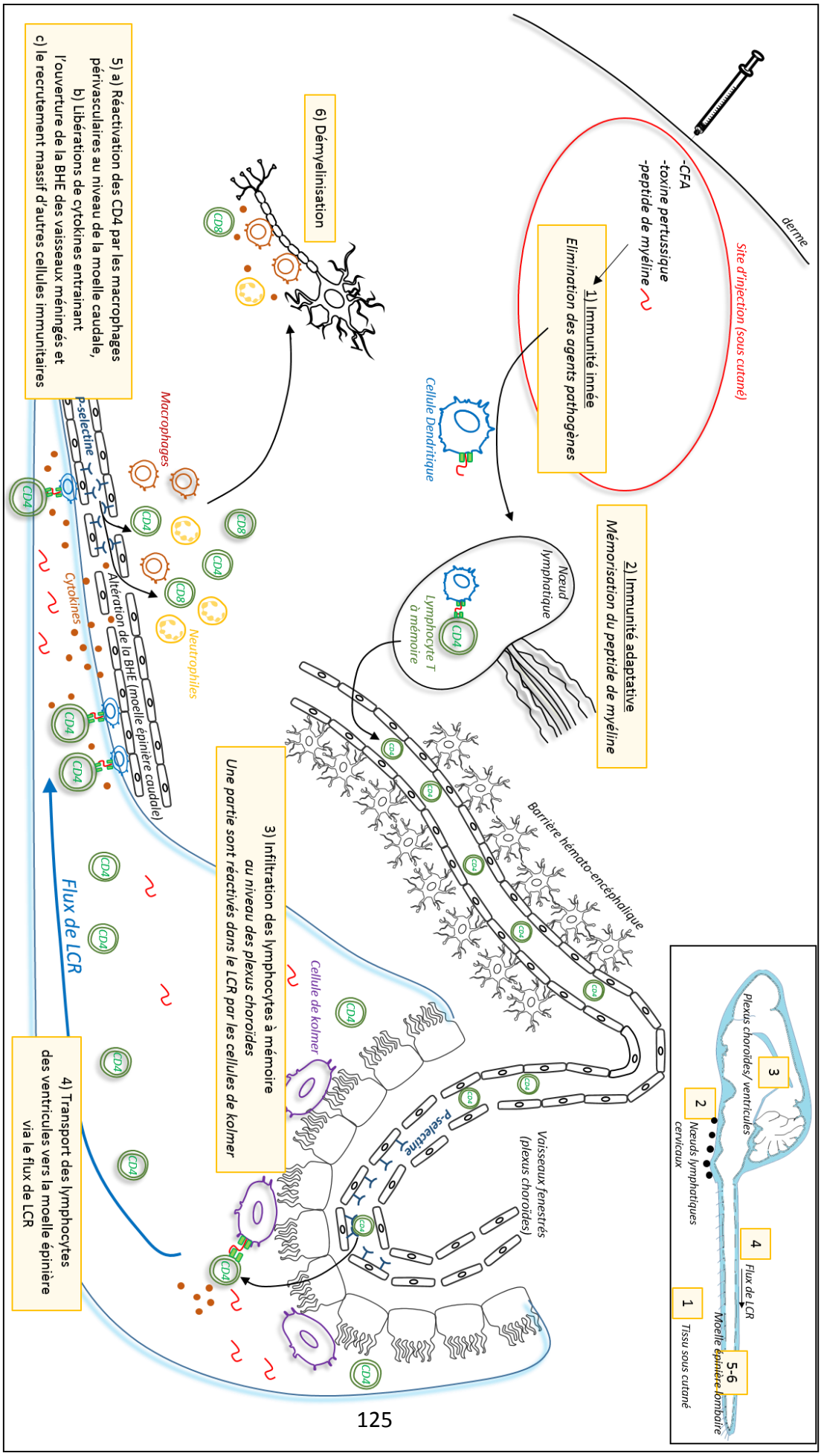


Figure 23 : schéma bilan résumant l'hypothèse de l'implication des PC et du flux de LCR dans la pathophysiologie de l'EAE.

Cette hypothèse est d'autant plus plausible que, lors d'un traumatisme médullaire, des macrophages sont capables de s'infiltrer à travers les PC et de voyager jusqu'à la lésion de la moelle épinière grâce au flux de LCR sous-arachnoïdien (Shechter *et al.*, 2013).

2. L'IRM moléculaire de l'inflammation intestinale ciblant MAdCAM-1

Cette étude rapporte l'adaptation de l'imagerie moléculaire pour la détection de l'inflammation intestinale. En ciblant MAdCAM-1, une protéine intestinale d'adhésion vasculaire et en utilisant des séquences IRM adaptées à l'imagerie de l'intestin, nous avons pu détecter avec une haute résolution spatio-temporelle l'activation vasculaire intestinale des animaux soumis à des modèles de pathologies intestinales et de SEP. L'imagerie moléculaire visant MAdCAM-1 est ainsi capable de démasquer l'inflammation intestinale, et pourrait permettre de faciliter le diagnostic de nombreuses pathologies. De plus, cette étude pourrait aider à prendre en compte la gestion de l'inflammation intestinale dans les soins aux patients atteints de SEP et apporter de nouvelles avancées dans le diagnostic et le pronostic des poussées de SEP en ciblant l'inflammation intestinale.

Une spécificité pour l'intestin

Il a été montré que MAdCAM-1, qui peut être exprimée sur les cellules épithéliales des plexus choroïdes, n'est cependant pas exprimée par les cellules endothéliales du SNC (Steffen *et al.*, 1996). En accord avec cela, nous n'observons pas de fixation des MPIOs-αMAdCAM-1 dans le cerveau des animaux LPS, malgré une importante inflammation révélée par les MPIOs-αVCAM-1. Ainsi, l'utilisation des MPIOs-αMAdCAM-1 n'interfère pas avec le signal induit par les autres MPIOs spécifiques du SNC, permettant ainsi d'imager à la fois l'intestin et le SNC sur les mêmes animaux.

Utilités pour la clinique

Les examens endoscopiques et les biopsies des zones saines et malades sont aujourd'hui essentiels pour évaluer l'intensité des poussées, l'étendue des lésions et ainsi confirmer le diagnostic de maladie de Crohn. L'IRM moléculaire non-invasive de MAdCAM-1 développée dans cette étude est capable d'apporter des informations qualitatives et quantitatives en

localisant les régions touchées et en mesurant le niveau de l'inflammation. Ainsi, elle pourrait permettre de réduire la fréquence d'utilisation des examens invasifs actuellement pratiqués en clinique. Aujourd'hui, l'IRM n'est pas utilisée dans le diagnostic de l'ischémie mésentérique, car elle n'apporte pas d'avantage particulier par rapport au scanner. L'IRM moléculaire de MAdCAM-1, qui s'est montrée efficace dans la détection de la région ischémique d'un modèle animal d'ischémie mésentérique pourrait ainsi permettre d'améliorer considérablement le diagnostic de cette pathologie.

Cette étude montre également que l'IRM moléculaire de MAdCAM-1 est compatible avec une utilisation répétée et rapprochée des examens IRM. En effet, le signal induit par les MPIOs diminue avec le temps, témoignant du décrochage de ces derniers. Quatre heures après l'injection, la majorité du signal a disparu. Ainsi, cette technique IRM semble compatible avec le suivi longitudinal des pathologies et le suivi de l'efficacité des traitements.

En plus d'aider au diagnostic et au suivi des pathologies intestinales, l'imagerie moléculaire de MAdCAM-1 pourrait également permettre de prendre en compte l'inflammation intestinale des patients atteints de SEP. En effet, en accord avec la description d'une altération de la barrière intestinale dans un modèle de SEP progressive (Nouri *et al.*, 2014), notre étude montre qu'une importante inflammation intestinale, se traduisant par une activation vasculaire, se produit pendant les poussées d'un modèle de SEP récurrente-rémittente. Cette inflammation intestinale ne peut pas être attribuée à l'injection des adjuvants utilisés dans l'EAE car ces derniers sont également injectés aux animaux contrôles. Ainsi, l'utilisation de probiotiques efficaces contre l'inflammation intestinale pourrait s'avérer bénéfique chez les patients atteints de SEP accompagnée d'une inflammation intestinale. Il a déjà été suggéré que la gestion de l'inflammation intestinale puisse s'avérer bénéfique dans la SEP car il n'est pas exclu que l'effet bénéfique du Natalizumab® dans la SEP puisse être en partie dû à un effet sur l'intestin, étant donné que l'intégrine VLA-4 partage sa sous unité α4 avec l'intégrine LPAM qui reconnaît MAdCAM-1 (von Andrian and Engelhardt, 2003).

Perspectives

Plusieurs éléments laissent penser qu'une SEP peut être déclenchée par un mimétisme moléculaire entre un peptide bactérien d'origine intestinale et un peptide de myéline (Cf introduction, chapitre 2.4.5.2). En accord avec cette idée, le syndrome de Guillain-Barré, une pathologie auto-immune des nerfs périphériques, est dans de nombreux cas déclenché après une infection intestinale par le pathogène *Campylobacter jejuni* (van den Berg *et al.*, 2014). La réaction inflammatoire qui suit la contamination par cet agent pathogène conduit à la production d'anticorps qui réagissent de manière croisée avec des protéines présentes sur les nerfs périphériques. En accord avec cette idée de mimétisme moléculaire avec des bactéries intestinales, nous avons remarqué qu'il est nécessaire de respecter une période d'acclimatation des animaux (obtenus chez un fournisseur extérieur) à l'animalerie pour que ces derniers puissent déclencher une EAE. Dans le cas contraire, l'incidence de l'EAE se voit considérablement réduite. Nous considérons que durant cette période, l'animal va entrer en contact avec les pathogènes endémiques à l'animalerie. Il serait intéressant de déterminer grâce à l'utilisation de l'IRM moléculaire de MAdCAM-1 si la présence d'une inflammation intestinale est nécessaire à l'induction d'une EAE chez la souris. De plus, nous pouvons imaginer que le niveau d'inflammation intestinale pré-symptomatique mesuré avec l'IRM moléculaire de MAdCAM-1 sera prédictif de la sévérité de l'EAE.

Il est décrit qu'un stress aigu est capable d'engendrer une inflammation intestinale accompagnée d'une augmentation de la perméabilité de la barrière intestinale (Kelly *et al.*, 2015; Vanhaecke *et al.*, 2017). De manière intéressante, les études épidémiologiques montrent qu'un stress aigu de la vie (décès d'un proche, divorce, déménagement, etc…) est souvent associé à la survenue d'une rechute chez les patients atteints de SEP (Mohr *et al.*, 2004). En accord avec cette observation clinique, nous avons constaté que l'application d'un stress aigu d'évitement de l'eau (*water avoidance stress*, WAS) multiplie par deux l'incidence des rechutes d'un modèle de SEP récurrente-rémittente (figure 24).

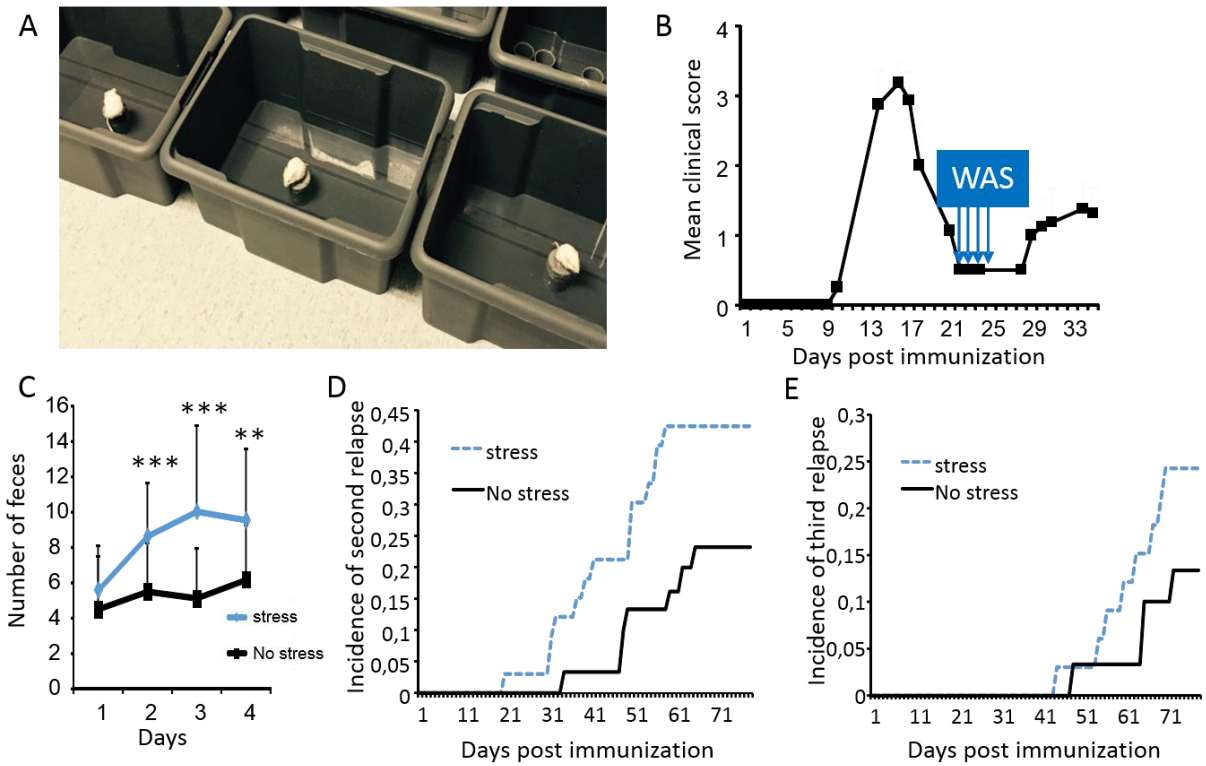


Figure 24 : L'application d'un stress aigu augmente l'incidence des rechutes d'un modèle de SEP récurrente-rémittente. (A) Photo du dispositif du stress d'évitement de l'eau (WAS) : les souris sont placées pendant une heure par jour durant quatre jours sur une plateforme entourée d'eau. (B) Le stress aigu d'évitement de l'eau est appliqué pendant la récupération complète des animaux (environ 3 semaines après l'induction de l'EAE). (C) Le stress aigu est validé par l'augmentation du nombre de fèces des animaux stressés. (D et E) L'incidence des deuxième et troisième poussées est augmentée chez les animaux EAE stressés par rapport aux animaux EAE non stressés.

Ainsi, en accord avec les données épidémiologiques, cette expérience montre qu'un stress aigu augmente le risque de survenue des poussées d'un modèle murin de SEP. Cette augmentation du risque de poussées pourrait-être due à une augmentation de l'inflammation et de la perméabilité intestinale. Cette hypothèse pourrait être vérifiée avec l'IRM moléculaire de l'inflammation ciblant MAdCAM-1, associée à des mesures de perméabilité de la BHE pour écarter l'effet direct du stress sur cette dernière. L'utilisation de probiotiques permet d'atténuer l'effet du stress aigu sur l'inflammation intestinale (Vanhaecke *et al.*, 2017). Il serait également intéressant d'évaluer l'efficacité de ces probiotiques contre l'augmentation du risque de poussées suite à un stress aigu dans la SEP et ses modèles.

3. Le système glymphatique dans l'EAE

Grâce à l'injection de traceurs compatibles avec l'IRM ou l'imagerie optique, cette étude met en évidence l'existence d'une circulation du LCR à travers le parenchyme de la moelle épinière. L'imagerie par IRM avec agent de contraste s'avère intéressante car elle permet de visualiser avec une bonne résolution spatiale et temporelle la circulation du LCR à travers le parenchyme du SNC *in vivo*. Ainsi, l'injection de gadolinium dans la citerne conduit à un rehaussement des espaces sous-arachnoïdiens de la moelle épinière, correspondant au flux de LCR sous-arachnoïdien précédemment décrit dans la littérature, mais également au rehaussement du parenchyme. Ce rehaussement décroît avec le temps, pour disparaître complètement en 24h. Ainsi, cette circulation du LCR dans le parenchyme, connu sous le concept de « système glymphatique », n'est pas restreinte à l'encéphale. En accord avec cela, les immuno-marquages révèlent la présence d'AQP-4 autour des vaisseaux sanguins de la moelle épinière, comme cela avait été décrit pour le cerveau.

Un système altéré en condition pathologique

L'utilisation des mêmes techniques révèle une altération de la diffusion du LCR dans le parenchyme de la moelle épinière chez les animaux soumis à une EAE. La diffusion du LCR n'est cependant pas altérée dans le cerveau chez ces mêmes animaux. Ainsi, le faible signal observé dans la moelle épinière en IRM et en imagerie optique ne peut pas être attribué à une mauvaise injection des traceurs. En accord avec ces observations, les immuno-marquages des animaux révèlent que l'infiltration leucocytaire, qui est faible dans l'encéphale, touche principalement la moelle épinière. Bien que certaines de ces cellules traversent les pieds astrocytaires et progressent dans le tissu, d'autres s'accumulent dans les espace péri-vasculaires contenus entre la lame basale et les pieds astrocytaires. Les immuno-marquages montrent que nombre des cellules contenues dans les espaces péri-vasculaires sont des LT $CD4^+$. Ainsi, en venant obstruer les espaces péri-vasculaires, ces cellules pourraient bloquer la circulation du LCR dans ces derniers. De manière intéressante, les immuno-marquages réalisés sur les animaux EAE révèlent également une perte de polarité de l'AQP-4 dans la moelle épinière : cette dernière n'est plus spécifiquement exprimée autour des vaisseaux, mais l'est également à l'intérieur du tissu. Cette expression anarchique de l'AQP-4, qui peut être due à une astrogliose, pourrait perturber la circulation du LCR dans le parenchyme spinal.

Tous ces éléments laissent penser que l'altération de la circulation du LCR dans le parenchyme de la moelle épinière n'est pas la cause de la maladie mais une conséquence de l'infiltration leucocytaire. En accord avec cette idée, la diffusion du LCR dans la moelle épinière n'est pas modifiée avant l'apparition de la maladie chez les animaux asymptomatiques.

Enfin, étant donné que l'altération de cette diffusion peut diminuer le drainage du LCR et entraîner une accumulation de ce dernier dans l'encéphale, nous avons étudié la taille des ventricules chez les animaux EAE. De manière frappante, les ventricules sont deux à trois fois plus grands chez les animaux EAE par rapport aux animaux contrôles. Il est peu probable que cet élargissement ventriculaire, qui apparaît en seulement 48h, puisse être attribué à une atrophie cérébrale.

Perspectives

Il a été suggéré que la circulation du LCR dans le parenchyme cérébral puisse être en partie provoquée par la pulsatilité artérielle. En effet, lors d'une systole cardiaque, un certain volume sanguin est expulsé du cœur et se propage dans les artères, provoquant des changements de pression à l'origine d'une onde pulsatile. Bien que la faiblesse des animaux EAE puisse provoquer des perturbations cardiaques, il est peu probable que ces dernières soient à l'origine de l'altération de la diffusion du LCR dans la moelle épinière sans toucher le cerveau. Il serait cependant intéressant de vérifier si une modification de la perfusion sanguine locale n'a pas lieu spécifiquement dans la moelle épinière des souris EAE.

Les souris déficientes en AQP-4, soumises à une EAE, développent une maladie moins forte que les souris sauvages (Li *et al.*, 2011). Cet effet bénéfique de l'absence d'AQP-4 pourrait être dû à une diminution du flux de LCR à travers le parenchyme cérébral, entraînant une diminution de la diffusion des cytokines pro-inflammatoires dans les phases précoces de la maladie. Il serait intéressant d'induire une diminution de la perfusion du LCR dans le parenchyme au cours des phases précoces de la maladie afin de vérifier si cela est également bénéfique sur l'évolution de celle-ci. L'injection d'acétazolamide, un inhibiteur de l'AQP-4 (Kamegawa *et al.*, 2016), dans la citerne d'animaux pré-symptomatiques, permettrait de répondre à cette question.

Conclusion

Les critères diagnostics de la SEP ont considérablement évolués au cours du temps. Les premières lignes directrices concernaient uniquement les résultats des examens cliniques neurologiques du patient. Par la suite, les critères diagnostics développés par Poser en 1983 se sont essentiellement appuyés sur la réalisation d'examens complémentaires plus objectifs, comme l'analyse du LCR, la mesure des potentiels évoqués visuels et la réalisation d'examens IRM. Les critères de McDonald développés en 2001 puis révisés en 2005 et 2010 notent la percée de l'IRM, qui est aujourd'hui devenue incontournable dans le diagnostic de la SEP.

À n'en pas douter, le diagnostic de la SEP sera encore amené à évoluer afin d'y ajouter de nouveaux critères d'imagerie. En effet, bien que les lésions T2/FLAIR ou positives au Gadolinium permettent d'objectiver un processus inflammatoire bien engagé, il serait intéressant de visualiser en IRM les évènements à l'origine de ces phénomènes inflammatoires, dans la perspective de diagnostics précoces et de pronostics d'évolution de la maladie.

Dans ce travail, nous avons développé une technique d'IRM moléculaire permettant de détecter avec une grande résolution spatiale et temporelle, l'activation vasculaire de la P-sélectine, qui fait partit des premières étapes des processus inflammatoires impliqués dans les modèles de SEP. De plus, l'IRM moléculaire de MAdCAM-1 développée dans cette thèse permet la mesure du niveau d'inflammation intestinale pouvant participer à la physiopathologie du modèle de SEP. Les stratégies développées dans ces études pourraient conduire à la création de nouveaux marqueurs d'imagerie utilisables en clinique dans le diagnostic de la SEP.

Tout comme le diagnostic, la compréhension de la physiopathologie de la SEP a considérablement évoluée au cours du temps. Ce qui n'était qu'une maladie auto-immune accompagnée d'une altération de la BHE est aujourd'hui considérée comme une pathologie plus complexe, impliquant plusieurs vagues d'infiltration et de nombreux acteurs nouveaux comme les plexus choroïdes et l'intestin. À l'image de cette complexité, nous avons mis en évidence l'altération du système glymphatique dans la moelle épinière des souris touchées par un modèle de SEP. Bien que l'altération de ce nouvel acteur semble être une conséquence de la maladie, due à l'accumulation de cellules immunitaires dans l'espace péri-vasculaire, elle pourrait avoir des implications importantes dans la physiopathologie de la SEP.

Autres Travaux

Brain Advance Access published July 19, 2016

doi:10.1093/brain/aww172 BRAIN 2016: Page 1 of 14 | 1

BRAIN
A JOURNAL OF NEUROLOGY

Neuroendothelial NMDA receptors as therapeutic targets in experimental autoimmune encephalomyelitis

Richard Macrez,[1,*] Maria C. Ortega,[2,*] Isabelle Bardou,[1] Anupriya Mehra,[1] Antoine Fournier,[1] Susanne M. A. Van der Pol,[3] Benoit Haelewyn,[4] Eric Maubert,[1] Flavie Lesept,[1,‡] Arnaud Chevilley,[1] Fernando de Castro,[2,5] Helga E. De Vries,[3] Denis Vivien,[1] Diego Clemente[2,6,§] and Fabian Docagne[1,§]

*,§These authors contributed equally to this work.

Multiple sclerosis is among the most common causes of neurological disability in young adults. Here we provide the preclinical proof of concept of the benefit of a novel strategy of treatment for multiple sclerosis targeting neuroendothelial *N*-methyl-D-aspartate glutamate receptors. We designed a monoclonal antibody against *N*-methyl-D-aspartate receptors, which targets a regulatory site of the GluN1 subunit of *N*-methyl-D-aspartate receptor sensitive to the protease tissue plasminogen activator. This antibody reverted the effect of tissue plasminogen activator on *N*-methyl-D-aspartate receptor function without affecting basal *N*-methyl-D-aspartate receptor activity ($n = 21$, $P < 0.01$). This antibody bound *N*-methyl-D-aspartate receptors on the luminal surface of neurovascular endothelium in human tissues and in mouse, at the vicinity of tight junctions of the blood–spinal cord barrier. Noteworthy, it reduced human leucocyte transmigration in an *in vitro* model of the blood–brain barrier ($n = 12$, $P < 0.05$). When injected during the effector phase of MOG-induced experimental autoimmune encephalomyelitis ($n = 24$), it blocked the progression of neurological impairments, reducing cumulative clinical score ($P < 0.001$) and mean peak score ($P < 0.001$). This effect was observed in wild-type animals but not in tissue plasminogen activator knock-out animals ($n = 10$). This therapeutic effect was associated to a preservation of the blood–spinal cord barrier ($n = 6$, $P < 0.001$), leading to reduced leucocyte infiltration ($n = 6$, $P < 0.001$). Overall, this study unveils a critical function of endothelial *N*-methyl-D-aspartate receptor in multiple sclerosis, and highlights the therapeutic potential of strategies targeting the protease-regulated site of *N*-methyl-D-aspartate receptor.

1 INSERM, INSERM-U919, Caen Cedex, F-14074 France; Université de Caen Basse–Normandie, Caen Cedex, F-14074 France; GIP Cyceron, Caen, F-14074 France
2 Grupo de Grupo de Neurobiología del Desarrollo-GNDe. Hospital Nacional de Parapléjicos – Toledo, Spain
3 Department of Molecular Cell Biology and Immunology, Neuroscience Campus Amsterdam, The Netherlands
4 Centre Universitaire de Ressources Biologiques, Université de Caen Basse-Normandie, Caen, France
5 Grupo de Neurobiología del Desarrollo-GNDe. Instituto Cajal. CSIC – Madrid, Spain
6 Grupo de Neuroimmuno-reparación. Hospital Nacional de Parapléjicos – Toledo, Spain

‡Present address: Department of Neuroscience, Physiology and Pharmacology, University College of London, UK

Correspondence to: Fabian Docagne, PhD
Inserm, Inserm UMR-S U919, Centre Cyceron, Bvd H. Becquerel, BP 5229, 14074
Caen Cedex, France
E-mail: docagne@cyceron.fr

Keywords: neuroinflammation; multiple sclerosis; *N*-methyl-D-aspartate receptors; tissue plasminogen activator; Glunomab

Received February 12, 2016. Revised May 6, 2016. Accepted June 2, 2016.
© The Author (2016). Published by Oxford University Press on behalf of the Guarantors of Brain. All rights reserved.
For Permissions, please email: journals.permissions@oup.com

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

Abbreviations: EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; NMDAR = *N*-methyl-D-aspartate receptor; tPA = tissue plasminogen activator

Introduction

Multiple sclerosis is a demyelinating disease characterized by an alteration of the blood–brain and the blood–spinal cord barriers, and the infiltration of immune cells into the CNS parenchyma, leading to myelin degradation and axonal damage.

Studies in animal models of multiple sclerosis have suggested that excitotoxicity, a toxic process resulting from the excessive activation of glutamatergic receptors, could play a role in this disease (Pitt *et al.*, 2000; Docagne *et al.*, 2007). Accordingly, antagonists of the glutamatergic *N*-methyl-D-aspartate receptors (NMDAR), such as memantine, attenuate white matter damages in experimental multiple sclerosis (Manning *et al.*, 2008). In addition to neurons, where they drive glutamatergic neurotransmission, NMDAR are expressed in a variety of cell types (Skerry and Genever, 2001; Boldyrev, 2005; Verkhratsky and Kirchhoff, 2007; Boldyrev *et al.*, 2013). In particular, brain endothelial cells express NMDAR, which could be involved in blood–brain barrier maintenance and alteration (András *et al.*, 2007; Reijerkerk *et al.*, 2010).

Several regulatory sites exist on the GluN1 subunit of NMDAR. Among them, a protease-regulated site has been identified (Nicole *et al.*, 2001; Fernández-Monreal *et al.*, 2004; Samson and Medcalf, 2006; Benchenane *et al.*, 2007), which leads to the potentiation of NMDAR signalling by the serine-protease tissue plasminogen activator (tPA). Interestingly, tPA was suggested to participate in the pathological features of animal models of multiple sclerosis. For instance, tPA was reported to promote demyelination by activation of plasminogen into plasmin (Cammer *et al.*, 1978) and indirect matrix metalloproteinase (MMP) activation (Cuzner and Opdenakker, 1999). In parallel, tPA was described to promote inflammatory reactions in the CNS by increasing the permeability of the blood–brain barrier (Lopes Pinheiro *et al.*, 2016) and by facilitating monocyte migration through the rat and human blood–brain barrier *in vitro* (Reijerkerk *et al.*, 2008, 2010). Noteworthy, tPA immunoreactivity in post-mortem tissues of patients with multiple sclerosis is associated with inflammatory cells in the perivascular compartment (Cuzner *et al.*, 1996) and tPA activity in the circulation correlates with disease progression (Akenami *et al.*, 1996).

In an earlier study, we showed that the blockade of the protease-regulated site of NMDAR provides therapeutic benefits in an animal model of stroke, an effect associated with reduced blood–brain barrier alteration (Macrez *et al.*, 2011). Also, previous work showed that NMDAR participate in leucocyte transmigration (Reijerkerk *et al.*, 2010). Therefore, we hypothesize that the protease-driven regulation of NMDAR may also play an important role in the pathology of multiple sclerosis.

In this study, we tested a strategy of immuno-intervention aimed at blocking the tPA-induced potentiation of endothelial NMDAR function. Interestingly, this strategy led to a prevention of disease progression in mouse experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). We then show that this therapeutic effect occurs via a direct action on endothelial cells, preventing the alteration of the blood–spinal cord barrier, resulting in a dramatic reduction of immune cell entry into the nervous system and a subsequent preservation of myelin.

Materials and methods

Animals

Male C57BL6/J mice (Janvier) were housed in our local conventional animal facility (CURB, University of Caen). All procedures were performed according to guidelines of the institutional ethics committee (*Comité Normand d'éthique en matière d'expérimentation animale*, CeNomExA). Projects were submitted to this committee for approval in accordance with the European directive no 2010/63/UE (agreement number D14 118 001).

Experimental autoimmune encephalomyelitis

Monophasic EAE was induced in 12-week-old male C57BL6/J mice (Janvier) via subcutaneous immunization with 200 µg recombinant myelin oligodendrocyte glycoprotein ($rMOG_{35-55}$) in an emulsion mixed (volume ratio 1:1) with Complete Freund's Adjuvant (CFA; Difco Laboratories) containing 600 µg of heat-killed *Mycobacterium tuberculosis* H37Ra (Difco). Control animals were injected with saline mixed with CFA containing 600 µg of heat-killed *M. tuberculosis*. All animals were intraperitoneally (i.p.) injected with 200 ng pertussis toxin derived from *Bordetella pertussis* (Sigma-Aldrich) in 200 µl saline at the time of, and 24 h after immunization.

Clinical score

Mice were examined daily for clinical signs of EAE and were scored as follows: 0, no disease; 1, limp tail; 2, hindlimb weakness; 3, complete hindlimb paralysis; 4, hindlimb paralysis plus forelimb paralysis; and 5, moribund or dead. Animals were euthanized if showing a loss of weight of ~10%. Clinical score was assessed daily by one person blinded to the treatment.

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

Transfection, immunocytochemistry and calcium video imaging in HEK-293 cells

Human embryonic kidney 293 cells (HEK-293 cells) were grown in the presence of reversible NMDA antagonists (200 μM AP5 and 2 mM $MgCl_2$) in a RPMI 1640 medium supplemented with 5% foetal bovine serum. Cells were transfected by the lipofection method (8 μl, FuGENE-6®), with a mixture containing 2 μg of pcDNA3-GluN1–1 b and 2 μg of pcDNA3-GluN2A. For immunostaining experiments, transfected HEK-293 cells were fixed and incubated overnight (4°C) with the Glunomab (1 μg/ml) in PBS with 4% bovine serum albumin (BSA). Finally, cells were incubated with a secondary anti-mouse FITC antibody (1:800) for 1 h at room temperature. Images were taken on a confocal microscope (Leica SP5). For calcium video imaging, cells were loaded in the presence of a HEPES-buffered saline solution containing 10 μM fura-2/AM plus 0.1% pluronic F-127 and 20% solution in dimethyl sulphoxide (30 min, 37°C) and incubated for an additional 45-min period in a HEPES-buffered saline solution. Experiments were performed on the stage of a Leica DMI6000B inverted microscope equipped of a Leica 40× objective. Fura-2 ratio images were digitized using Metafluor® 6.1 software (Universal Imaging Corporation).

Epitope mapping

A total of 141 overlapping pentadecapeptides, frame-shifted by three residues covering the entire amino acid sequence of GluN1 N-terminal domain (residues 19–371). Briefly, peptides were assembled using Fmoc chemistry on a cellulose membrane containing an aminopolyethyleneglycol moiety. The C-terminal residue of each peptide was coupled to the moiety. After Fmoc deprotection, the other amino acids were sequentially added. Finally the side-chain protecting groups were removed by trifluoroacetic acid treatment in the presence of appropriate scavengers, while the linkage of the peptides to the membrane was maintained. Free cysteines were replaced with non-reactive acetamidomethyl cysteines. Purified monoclonal antibodies were incubated on the membrane, and revealed by a classical western blotting method.

Monocyte and T cell migration

Peripheral blood mononuclear cells were isolated from buffy coats obtained from healthy donors (Sanquin Blood Bank, Amsterdam, The Netherlands) using Ficoll density gradient (Lymphoprep™, Axis-Shield). For isolation of monocytes and T cells, we used anti-CD14 magnetic beads (Miltenyi Biotec) with a MACS® MultiStand and LS Column by passing 3 ml of MACS buffer [2 mM EDTA and 0.1% foetal calf serum in phosphate-buffered saline (PBS)] according to the manufacturers' protocol. Human T cell purity was >96% as assessed by expression of CD3 using flow cytometry performed (FACSCalibur™) using CELLQuestTM software (BD Biosciences). Isolated T cells were cultured for 48 h before experiments. Effector T cells were generated by adding IL-2 (10 ng/ml) and phytohaemagglutinin (1 μg/ml) during 48 h (Kooij *et al.*, 2014). The immortalized human brain endothelial cell line hCMEC/D3, which establishes the key features of brain endothelium, was cultured as described previously (Weksler *et al.*, 2005). Migration of primary human monocytes and T cells across confluent monolayers of hCMEC/D3 cells was studied with time-lapse video microscopy as described previously (Mizee *et al.*, 2014). Freshly isolated human monocytes or lymphocytes were added (7.5×10^5 cells/ml) to hCMEC/D3 cells, and the number of migrated cells was assessed after 4 h.

Passive immunization

Injection in the tail vein with the anti-NMDAR monoclonal antibody (15A4B2E5: Glunomab) or control anti-NMDAR monoclonal antibody (6C9B6G11: control isotype) (160 μg in 200 μl each) was performed at the time indicated (Fig. 1A) after EAE onset (MOG). Animals were randomly assigned to the experimental groups. Mortality was null for all procedures/treatments.

Tissue sampling, histology and immunohistochemistry

Three animals from each group were perfused transcardially with 4% paraformaldehyde (PFA) in 0.1 M phosphate buffer, pH 7.4, and their brain and spinal cords were dissected out and post-fixed in the same fixative for 4 h at room temperature. In addition, human post-mortem tissue of non-neurological control cases ($n = 3$) was obtained by rapid autopsy and immediately frozen in liquid nitrogen (The Netherlands Brain Bank, Amsterdam, coordinator Dr Huitinga). The Netherlands Brain Bank received permission to perform autopsies for the use of tissue and for access to medical records for research purposes from the Ethical Committee of the VU University Medical Centre, Amsterdam, The Netherlands. All patients and controls, or their next of kin, had given informed consent for autopsy and use of their brain tissue for research purposes.

In the case of NMDAR immunohistochemistry, the animal underwent perfusion with saline-heparin only (without PFA fixation). After immersion in increasing concentrations of sucrose [until 30% (w/v)], tissue was cut in coronal cryostat sections (20 -μm thick: Leica, Nussloch) and thaw-mounted on Superfrost® Plus slide. After several rinses with phosphate buffer, the sections used for all immunohistochemistry experiments except for NMDAR, were pre-treated for 20 min with phosphate buffer containing 3% H_2O_2, 10% methanol (or methanol alone for immunofluorescence experiments) and they were then preincubated for 1 h at room temperature in incubation buffer: 5% appropriate normal serum (Vector) and 0.2% Triton™ X-100 (Merck) diluted in PBS. In the case of NMDAR immunohistochemistry, the tissue sections were post-fixed with 4% PFA for 15 min, blocked with 0.2% BSA in Coon's buffer, and washed in Coon's buffer. Immunohistochemistry was performed by incubating sections overnight at 4°C with the following primary antibodies (diluted in incubation buffer): Glunomab (1:500), polyclonal goat anti-collagen IV antibody (1:1000), monoclonal rat anti-podocalyxin (R&D Systems #192703, 1:250. Kindly provided by Prof. Eduardo Soriano), monoclonal rat anti CD31 (BD #553370, 1:2000), polyclonal goat anti-GluN1 C-terminal antibody GluN1 (Santa Cruz sc1467, 1:100), rabbit

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

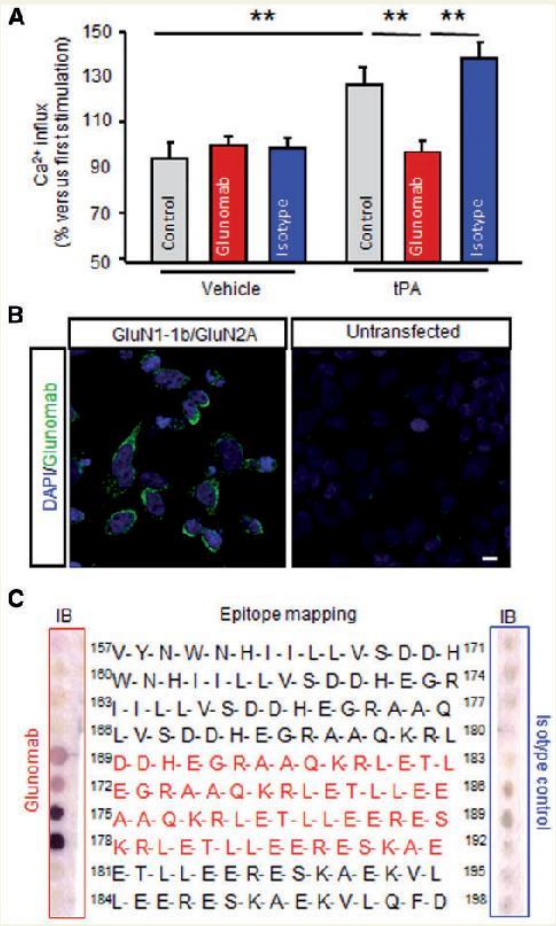


Figure 1 A monoclonal antibody directed against NTD-GluN1 (Glunomab), prevents the potentiation of NMDA-induced calcium influx by tPA. (**A**) Calcium video imaging performed on HEK-293 cells transiently co-transfected with GluN1-1B and GluN2A. After NMDA stimulations (used as baseline), transfected cells were incubated for 20 min with either buffer (control, $n = 20$ cells), tPA (300 nM, $n = 26$), 6C9B6G11 (control isotype) (10 μg/ml, $n = 25$), Glunomab (10 μg/ml, $n = 21$) alone or in combination (tPA + control isotype, $n = 28$; tPA + Glunomab, $n = 30$), prior to a second set of NMDA stimulations. Although antibodies from clone control isotype failed to influence tPA-induced potentiation of NMDA-induced calcium influx, Glunomab completely abolished it (three independent experiments; $^{**}P < 0.01$). (**B**) Illustrative images of immunstaining with Glunomab on HEK-293 cells previously transfected or not with GluN1-1B and GluN2A. Scale bar = 15 μm. (**C**) Immunoblotting of a total of 141 overlapping pentadecapeptides frame-shifted by three residues covering a part of the amino acid sequence of GluN1 NTD (amino acids 19–371) was revealed with Glunomab and control isotype. The figure represents 10 of 141 peptides analysed (amino acids 157–198). Epitope mapping identified the epitope for Glunomab (in red, amino acids 163–192).

monoclonal anti-claudin-5 (Abcam ab131259, 1:1000), rabbit monoclonal anti-occludin (Abcam ab167161, 1:1000) rabbit polyclonal anti-ZO-1 (Abcam ab59720, 1:1000), rat monoclonal anti-CD11b (AbD Serotec MCA74G, 1:250), rat monoclonal anti-Ly-6B.2 (AbD Serotec MCA771G, 1:100), mouse monoclonal anti-MHC-II (eBiosciences 14-5321-81, 1:200,), mouse monoclonal anti-CD11c (eBiosciences 13-0114-81, 1:200), rat monoclonal anti-CD4 (eBiosciences 14-0042 1:25) or tomato lectin (biotinylated, 15 μg/ml, Sigma-Aldrich). The sections were then incubated in buffer containing the corresponding fluorescent secondary antibodies for 1 h at room temperature T (1:1000, Invitrogen). Renaissance® TSA™ Biotin System Kit (PerkinElmer) together with Texas Red®-conjugated Streptavidin (1:200; Jackson Laboratories) was used in the staining procedure for CD11c labelling. The cell nuclei were stained with Hoechst 33342 (10 μg/ml, Sigma-Aldrich). Tomato lectin reaction was detected with Vectastain Elite ABC reagent (Vector Laboratories). The peroxidase reaction product was visualized with 0.05% 3,3′-diaminobenzidine (Sigma-Aldrich) and 0.003% H_2O_2 in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.6) and the reaction was monitored under a microscope and terminated by rinsing the slides with phosphate buffer. Eriochrome cyanine for myelin staining was performed as previously described (Moliné-Velázquez *et al.*, 2011).

Confocal imaging and 3D reconstruction

Images of double immunostaining (Collagen IV and Glunomab) were collected using a Leica SP5 confocal microscope with a 100× oil-immersive objective (Leica Microsystems). Confocal images were taken at a 1024 × 1024 pixel resolution with a *z*-step of 0.4 μm.

The 3D structure of the vessel was reconstructed from confocal images using Imaris software (version 5.5, Bitplane, Zurich, Switzerland). Volume and surface functions were used.

Flow cytometry analysis of CNS inflammatory cells

Mice were euthanized and perfused with PBS. Spinal cords were digested with collagenase IV (54 U/ml, Sigma-Aldrich) for 45 min at 37°C, resuspended in 30% Percoll®, and loaded onto 30/70% Percoll® gradient. After centrifuge at 1300*g* for 30 min, myelin was removed from the top of the gradient and the CNS inflammatory cells were collected in PBS. Cells (10^5) were resuspended in 50 μl of staining buffer (sterile PBS supplemented with 1% BSA, 1% foetal bovine serum) and the Fc receptors were blocked for 10 min at 4°C with anti-CD16/CD32 antibodies (BD Biosciences 553142, 10 μg/ml). After blocking, the cells were labelled with various fluorochrome-conjugated monoclonal antibodies: anti-mouse CD11b PerCP Cy5.5 (BD Biosciences 550993), anti-mouse F4/80-eFluor 450 (eBiosciences 48-4801-82) and anti-mouse CD3ε APC (BD Biosciences 553066). CNS inflammatory cells were washed twice with staining buffer, they were recovered by centrifugation at 1500 rpm for 5 min at room temperature, resuspended in PBS and finally, the samples were assayed in a FACSCanto™ II cytometer (BD Biosciences). The data were analysed with FlowJo 7.6.4 software (TreeStar Inc.)

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

Statistical analyses

Results are presented as mean ± standard error of the mean (SEM). For calcium video imaging of HEK-293 cells, the responsiveness was analysed by Wilcoxon signed-rank test to compare pre-and post-incubation response. In addition, for group comparison, Kruskal-Wallis tests were used followed by Mann-Whitney U-tests as *post hoc* tests. Other statistical analyses were performed by the Kruskall-Wallis' test, followed by *post hoc* comparison with the Mann-Whitney's test.

Results

Design of a blocking monoclonal antibody directed against the protease-regulated site of NMDAR

The main goal of this study was to elaborate a strategy of immune-intervention directed against the site of interaction of tPA with NMDAR. To this end, we developed a monoclonal antibody directed against the precise site of interaction of tPA with NMDAR, which could prevent the effects of tPA on NMDAR function. We first screened a series of monoclonal antibodies generated using the recombinant N-terminal domain (residues 19–371) of GluN1 NTD as antigen. Positive antibodies on ELISA for GluN1-NTD (data not shown) were then selected for their ability to block the potentiating effects of tPA on NMDAR function as assessed by calcium imaging in HEK-293 cells engineered to express NMDAR (Fig. 1). One clone (15A4B2E5: Glunomab) was chosen on this functional basis (Fig. 1A and Supplementary Fig. 1A). In transfected HEK-293 cells, tPA (300 nM) increased NMDA-induced Ca^{2+} influx by ~40%. Noteworthy, the co-application of Glunomab prevented this effect of tPA (Fig. 1A; $P < 0.01$), while Glunomab did not influence NMDA-evoked signalling in the absence of tPA (Fig. 1A). As expected, Glunomab stained HEK-293 cells transfected with GluN1, but not untransfected cells (Fig. 1B). Another clone, 6C9B6G11 (control isotype, Supplementary Fig. 1A and B), failed to block tPA-mediated potentiation of NMDAR function (Fig. 1A) and was used as a control isotype throughout the rest of the study. Epitope mapping showed that Glunomab epitope was localized between amino acids 169 and 192 of GluN1 sequence (Fig. 1C). This portion of GluN1 sequence is fully conserved between mouse, rat and human (data not shown).

Glunomab prevents leucocyte transmigration through the blood–brain barrier *in vitro*

We used a human *in vitro* model of the blood–brain barrier (hCMEC/D3 cells; Weksler *et al.*, 2005) to test the ability of Glunomab to block leucocyte transmigration. First, we confirmed that Glunomab antibody was able to stain NMDAR on endothelial cells in this model (Fig. 2A). We next showed that, under inflammatory condition (TNF treatment), Glunomab significantly blocked human monocyte migration (+50% of migrated monocytes for TNF alone compared to basal condition and −63% of migrated monocytes for the condition TNF + Glunomab compared to TNF alone; $n = 12$, $P < 0.05$; Fig. 2B). tPA treatment increased the transendothelial migration of human monocytes in non–inflammatory condition and in the presence of TNF (+38% compared to control and 16% compared to TNF condition, respectively; $n = 12$, $P < 0.05$; Fig. 2C). Importantly, Glunomab antibody was also able to block the increase in human monocyte migration induced by tPA treatment (+38% of migrated monocytes for TNF + tPA compared to TNF alone, −53% of migrated monocytes for TNF + tPA + Glunomab compared to TNF + tPA and −38% of migrated monocytes for TNF + tPA + Glunomab compared to TNF + tPA + control isoptype; $n = 12$, $P < 0.05$ Fig. 2D). This effect was not limited to monocyte migration, as it also significantly blocked human T cell migration using similar conditions (+70% of migrated T cells for TNF as compared to basal condition and −58% of migrated T cells for TNF + tPA + Glunomab as compared to TNF + tPA; $n = 12$, $P < 0.05$; Fig. 2E). Control isotype displayed limited, non-significant effects in these experiments (Fig. 2B, D and E).

Glunomab binds to NMDAR in the vicinity of neuroendothelial tight junctions of the blood–spinal and blood–brain barrier

Based on these *in vitro* data, our next step was to test if Glunomab was able to bind and stain NMDAR on spinal cord endothelium. We observed a positive immunostaining with Glunomab on mouse spinal cord microvessels of control animals (Fig. 3A). A similar pattern of staining was observed when using an antibody directed against the C-terminal end of GluN1 (Fig. 3A). Glunomab also revealed endothelial NMDAR in human tissues (Fig. 3B). Interestingly, Glunomab revealed NMDAR co-localized with the tight junction proteins claudin 5, occludin 1 and zona occludens 1 on mouse spinal cord endothelium (Fig. 3C and Supplementary Fig. 2A). Similar pattern of expression and co-localization was observed on mouse brain microvessels (Supplementary Fig. 2B). In contrast, no staining was observed with Glunomab in brain microvessels devoid of tight junctions, such as fenestrated capillaries of the external zone of the median eminence (Fig. 3D and Supplementary Fig. 3). These data show that NMDAR are expressed on tight junction-containing, blood–brain/blood–spinal cord barrier-forming endothelial cells. Using confocal microscopy after co-immunostaining of Glunomab with collagen IV and podocalyxin, a marker of luminal

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

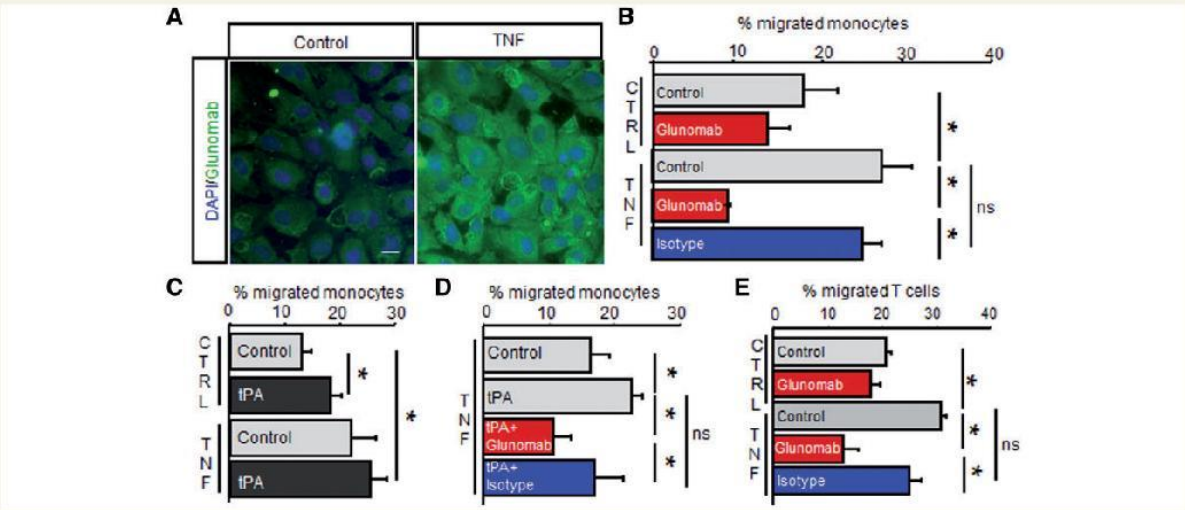


Figure 2 Glunomab prevents immune cell transmigration through the blood–brain barrier *in vitro*. (**A**) Illustrative picture of Glunomab staining on endothelial cells (hCMEC/D3 cells) on basal condition (control) and after TNF stimulation (*right*). Scale bar = 15 μm. (**B**) Human monocyte migration across hCMEC/D3 endothelial cells; effect of Glunomab on control and TNF treated endothelial cells compared to control isotype (n = 12 in each condition, three independent experiments; $*P < 0.05$). (**C**) Human monocyte migration across TNF treated hCMEC/D3 endothelial cells and the added effect of tPA (n = 12 in each condition, three independent experiments; $*P < 0.05$). (**D**) Human monocyte migration across TNF treated human brain endothelial cells and the added effect of tPA plus inhibition by Glunomab compared to control isotype (n = 12 in each condition, three independent experiments; $*P < 0.05$). (**E**) Human T cell migration across hCMEC/D3 endothelial cells; effect of Glunomab on control and TNF treated endothelial cells compared to isotype (n = 12 in each condition, three independent experiments; $*P < 0.05$). ns = non-significant.

surface, and 3D image reconstruction, we were able to show that endothelial NMDAR are located at the luminal surface of CNS endothelium (Fig. 4 and Supplementary Video 1).

Glunomab stops symptom progression in EAE by preventing blood–spinal cord barrier leakage and immune cell infiltration

The above data show that Glunomab is able to block immune cell migration across neurendothelial cells *in vitro* and that this antibody binds NMDAR expressed on the neuroendothelium *in vivo*. We thus hypothesized that Glunomab could provide therapeutic effects in experimental multiple sclerosis. Based on this, we then tested the effects of Glunomab in MOG-induced EAE. Our first approach was to perform three intravenous injections of Glunomab (160 μg per mouse) at the onset, the effector phase and the chronic phase of EAE. This treatment led to a general reduction of clinical score throughout the disease ($P < 0.001$ from Day 6 post-onset to the end of treatment, Fig. 5A), illustrated by a reduced cumulative clinical score (36.7 ± 5.5 versus 72.4 ± 14; n = 24 mice per group, $P < 0.001$; Fig. 5B) and a reduced mean peak score (1.9 ± 0.37 for Glunomab treated mice versus 3.4 ± 0.44 for the isotype control; n = 24 mice per group, $P < 0.001$; Fig. 5C). We then tested the therapeutic efficacy of a single injection of Glunomab performed during the effector phase of the disease. This single injection was enough to provide a conspicuous therapeutic effect characterized by a complete blockade of disease progression (Fig. 5D, $P < 0.001$ from Day 9 post-onset to the end of treatment), illustrated by a reduced cumulative clinical score (63.4 ± 2.2 versus 41.3 ± 3.3, n = 24 per group, $P < 0.001$; Fig. 5E) and a reduced mean peak score (2.2 ± 0.56 for Glunomab treated mice versus 3.9 ± 0.18 for the isotype control; n = 24 mice per group, $P < 0.001$; Fig. 5F). Noteworthy, in tPA knockout animals, Glunomab did not induce any modification of clinical score throughout the disease (Supplementary Fig. 4A), cumulative clinical score (Supplementary Fig. 4B) or mean peak score (Supplementary Fig. 4C).

Histological analysis showed that mice treated with Glunomab displayed a dramatically reduced demyelination within inflammatory lesions (14.69% ± 2.05% for EAE mice treated with the control isotype antibody versus 0.3% ± 0.1% for EAE mice treated with Glunomab; n = 6, $P < 0.001$; Fig. 5G–I).

One week after the injection of the isotype antibody during the effector phase of EAE, we observed a classical pattern of endothelium activation characterized by the expression of tomato lectin and VCAM-1 on microvessels of the spinal cord (Fig. 6A and B), together with an increase in

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

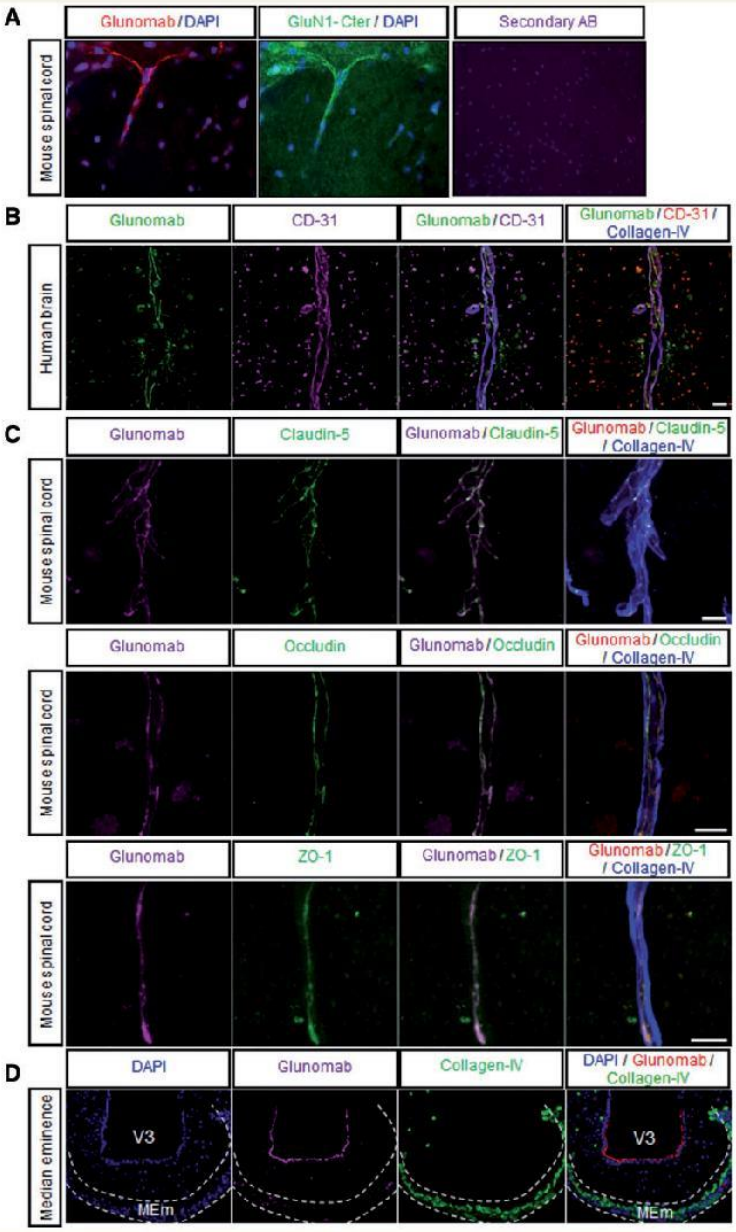


Figure 3 NMDAR co-localized with tight junction proteins on endothelial cells at the blood–spinal cord barrier. (**A**) Photomicrographs show immunostaining from parallel sections for GluN1 subunit on endothelial cells in a blood vessel on the spinal cord of sham mice by immunofluorescent staining with Glunomab (directed to N-terminal domain of GluN1, in red) and anti-C-terminal domain of GluN1 (GluN1-Cter, in green). Scale bar = 10 μm. (**B**) Confocal photomicrographs show immunostaining for Glunomab (green), CD 31 (red) and collagen IV (blue) in human brain. Scale bar = 20 μm. (**C**) Confocal photomicrographs show immunostaining for Glunomab (red), collagen IV (blue) and claudin-5 (green, scale bar = 10 μm), occludin (green, scale bar = 10 μm) and ZO-1 (green, scale bar = 5 μm) in the spinal cord of sham mice. (**D**) Photomicrographs show immunostaining for Glunomab (in red), and collagen-IV (green) in naïve mice. Note the absence of Glunomab staining in vessels of the external zone of the median eminence (MEm). V3 = third ventricle. Scale bar = 50 μm.

the permeability of the blood–spinal cord barrier reflected by fibrinogen leakage into the perivascular parenchyma (Fig. 6A and B). In contrast, treatment with Glunomab resulted in a drastic reduction of immunostaining for tomato lectin and VCAM1 on microvessels and for fibrinogen in the spinal cord parenchyma (−42%, −94% and −84%, respectively compared to control isotype treatment, $P < 0.01$; Fig. 6A and B). These data suggest that

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

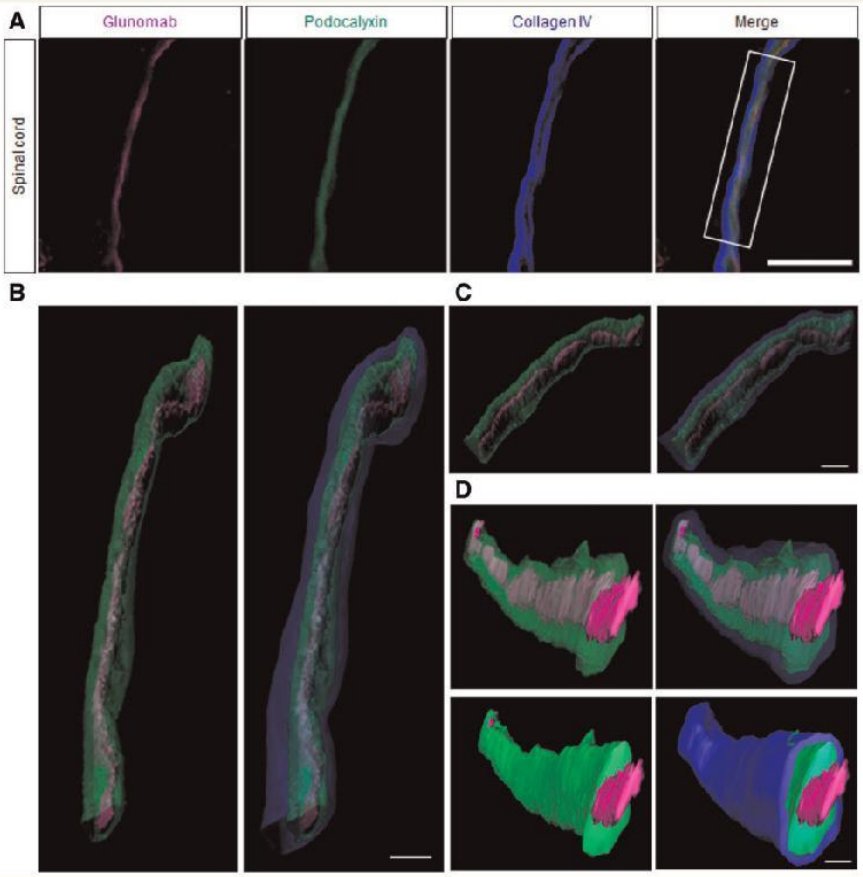


Figure 4 NMDAR displayed at the luminal surface of neurovascular endothelium. Confocal analysis of Glunomab staining (magenta) location in a collagen IV (blue) and podocalyxin (green) labelled white matter capillary. (**A**) Image of a longitudinal capillary showing Glunomab immunostaining in a luminal location with respect to the collagen and podocalyxin immunoreactivity of the endothelial cells. (**B**) Tridimensional reconstruction from the capillary showed in **A** (section indicated with white box), top view. (**C**) Tridimensional reconstruction from the capillary showed in **A** (section indicated with white box), side view. (**D**) Perpendicular view of the solid 3D reconstruction of the capillary showed in **A**. Scale bars: **A** = 10 μm; **B** and **D** = 2 μm; **C** = 3 μm.

Glunomab acts on the neurovasculature in EAE by restoring blood–spinal cord barrier function.

We next asked whether this action on blood–spinal cord barrier functions could lead to modifications of immune cell entry towards the parenchyma in EAE mice. Flow cytometry analysis showed a reduction in both myeloid and lymphoid populations in the spinal cord of MOG-induced EAE mice when treated with a single injection of the Glunomab (Fig. 7A and B). These data were confirmed by histological analysis of the demyelinated area of the spinal cord, with drastic reductions in the number of $CD11b^+$ (macrophages/microglia), $Ly6B.2^+$ (neutrophils), $MHC\text{-}II^+$ (antigen-presenting cells), $CD11c^+$ (dendritic cells) and $CD4^+$ (T4 lymphocytes) cells (Fig. 7C and D) in EAE mice treated with the Glunomab [−86%, −100% (non-detected), −79%, −90% and −100% (v), respectively compared to control isotype treatment; $n = 6$ mice per group, $P < 0.001$; Fig. 7D]. Flow cytometry analysis from spleens showed that Glunomab treatment did not influence lymphocyte activation (Supplementary Tables 1 and 2).

Discussion

The present study reports the therapeutic effects of a strategy of immunointervention targeting neuroendothelial NMDAR in experimental multiple sclerosis. Blocking the action of the serine protease tPA on NMDAR by using a novel monoclonal antibody (Glunomab) results in a reduced severity of the disease with a drastic reduction of inflammation and demyelination. Glunomab targets endothelial cells and leads to a reduced transmigration of immune cell through the blood–spinal cord barrier, which sustains its therapeutic effects. Glunomab is effective when

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

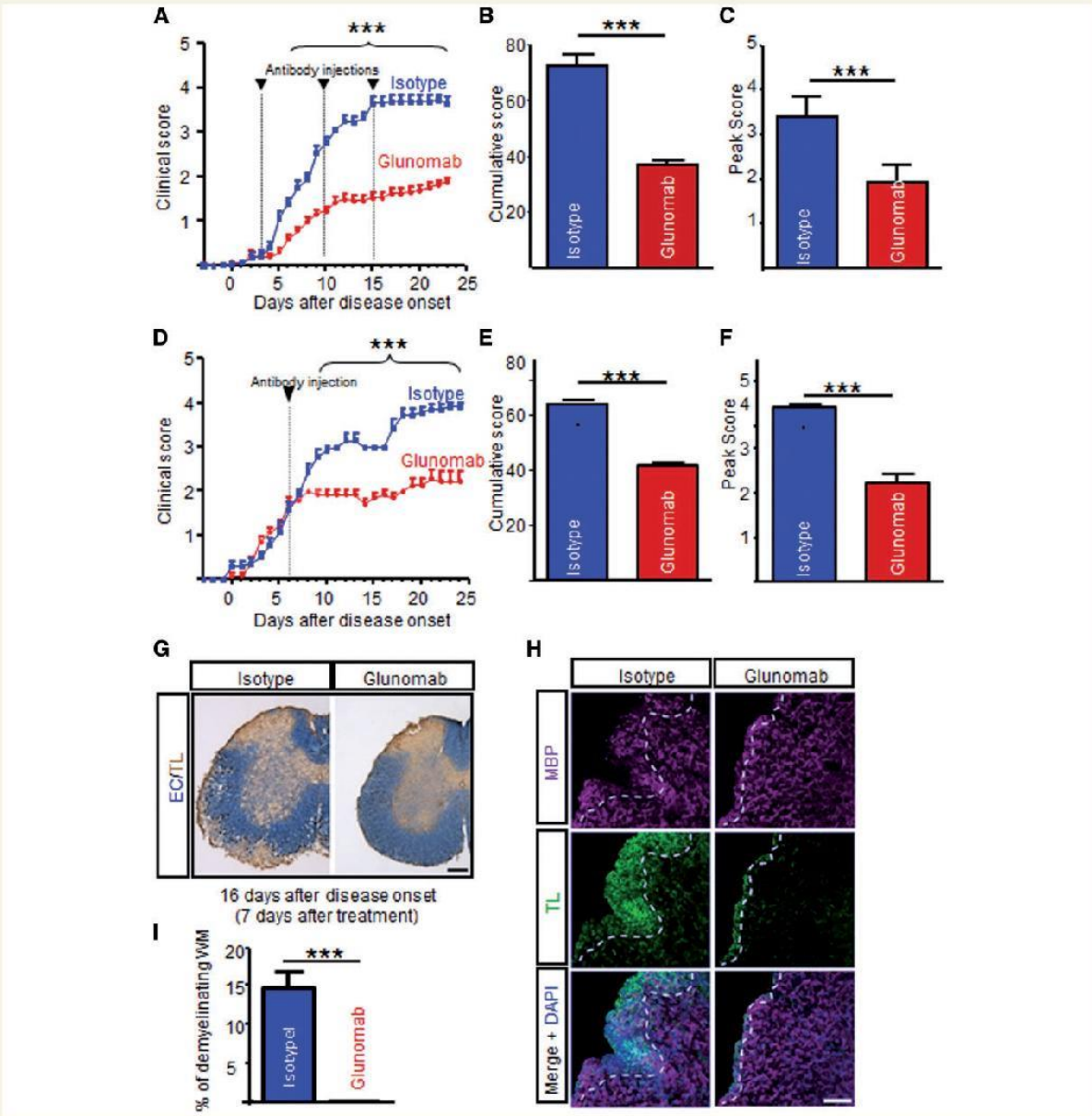


Figure 5 Glunomab stops the progression of MOG-EAE. (**A**) MOG-EAE mice were injected with Glunomab (red line, 160 μg) or control isotype (blue line, 160 μg) 3, 10 and 15 days after the onset of symptoms. Clinical score was assessed daily by one examiner blinded to the treatment (n = 24 per group; ***$P < 0.001$). (**B**) Histrogram shows cumulative clinical score (mean ± SEM) for glunomab and control isotype groups. ***$P < 0.001$. (**C**) Histogram shows mean score at the peak of disease (mean ± SEM) for Glunomab and control isotype groups. ***$P < 0.001$. (**D**) MOG-EAE mice were injected with Glunomab (red line, 160 μg) or control isotype (blue line, 160 μg) 6 days after the onset of symptoms. Clinical score was assessed daily by one examiner blinded to the treatment (n = 24 per group, ***$P < 0.001$). (**E**) Histogram shows cumulative clinical score (mean ± SEM) for Glunomab and control isotype groups. ***$P < 0.001$. (**F**) Histogram shows mean score at the peak of disease (mean ± SEM) for Glunomab and control isotype groups. ***$P < 0.001$. (**G**) *Left*: Illustrative example of spinal cord of isotype injected mice (7 days after injection) clear demyelinating areas [eriochrome cyanine (EC) staining, bordered with a dashed line] filled with tomato lectin (TL)-positive cells. *Right*: Representative image of spinal cord of Glunomab injected mice (7 days after injection) showing no signs of overt demyelination or tomato lectin staining. Scale bar = 500 μm. (**H**) Immuno-fluorescent staining for myelin basic protein (MBP, magenta) and tomato lectin (TL, green) in spinal cord tissue derived from EAE-mice treated with isotype antibody or treated with Glunomab 16 days after disease onset (7 days after glunomab or isotype treatment). Scale bar = 60 μm. (**I**) Histogram representing the percentage of demyelinated area/white matter area for Glunomab-treated mice compared to isotype treated mice (n = 6 mice per group, ***$P < 0.001$; ND = non-detected).

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

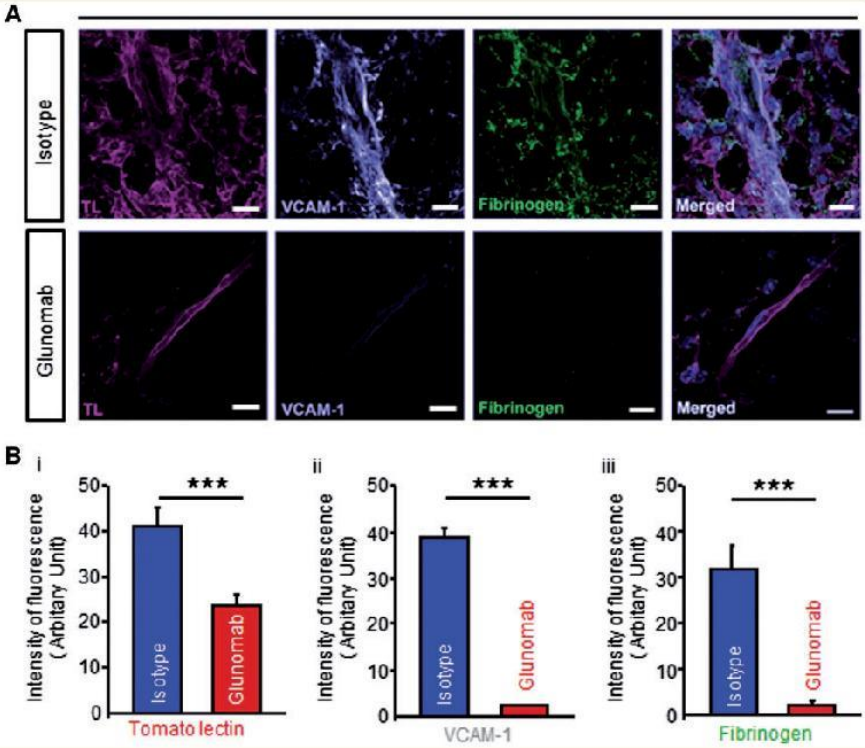


Figure 6 Glunomab drastically reduces endothelial activation and BSCB leakage. (**A**) Immuno-fluorescent staining of Tomato- Lectin (TL; magenta), VCAM-1 (white) and fibrinogen (green) in spinal cord tissue derived from EAE-mice treated with isotype antibody or treated with Glunomab 16 days after disease onset (7 days after glunomab or isotype treatment). Scale bar = 50 μm. (**B**) Histograms show quantification of intensity of fluorescence of (**i**) TL, (**ii**) VCAM1 and (**iii**) fibrinogen in the spinal cord of EAE mice (16 days after disease onset and 4 days after Glunomab (red bars) or control isotype (blue bar) treatment (arbitrary units, $n = 6$ mice per group, $^{***}P < 0.001$).

injected during the effector phase of EAE, in symptomatic animals (clinical score 2). Noteworthy, this timing of treatment corresponds to a stage of ongoing blood–brain barrier and blood–spinal cord barrier alterations (Floris *et al.*, 2004), which is compatible with the proposed mechanism of action on blood–brain/blood–spinal cord barriers. In addition to this, Glunomab binds the luminal surface of the neurovascular endothelium, in the vicinity of tight junction proteins. This sustains the proposed mode of action, which resides in a blockade of blood–brain/blood–spinal cord barrier alterations and subsequent entry of immune cells into the parenchyma.

We describe that NMDARs are localized at the luminal surface of neurovascular endothelium, in relation to tight junction proteins zona occludens 1, claudin 5 and occludin. This complements the previous observation of NMDAR in cultured human brain endothelial cells, as well as *in vivo*, in the mouse brain vasculature (Reijerkerk *et al.*, 2010).

The fact that NMDAR are displayed by endothelial cells raises the question of their function. Our study highlights their role in the regulation of the blood–spinal cord barrier during neuroinflammatory conditions. Previous reports showed that EAE symptoms were reduced by the voltage-dependent NMDAR antagonist memantine (Paul and Bolton, 2002; Sulkowski *et al.*, 2013), together with a reduced blood–brain barrier permeability. However, the ultimate mechanisms involved are not fully understood. NMDAR activation could lead to blood–brain or blood–spinal cord barrier permeability by alteration of occludin expression and distribution (András *et al.*, 2007) or mitochondrial toxicity (Kamat *et al.*, 2015). Production of reactive oxygen species (Sharp *et al.*, 2003; Scott *et al.*, 2007) and polyamines (Bolton and Paul, 2006), rise in intracellular calcium (Sharp *et al.*, 2003) or activation of intracellular kinases (Basuroy *et al.*, 2006) have all been proposed as potential mediators of this effect. All of these processes are known mediators of excitotoxicity in neurons, which suggests that endothelial NMDAR-induced blood–brain or blood–spinal cord barrier permeability could share features with neuronal NMDAR-induced excitotoxic death. Beyond these toxic effects due to excessive stimulation of NMDAR, a physiological pathway mediated by NMDAR must exist in endothelial cells. The role of this physiological pathway and its precise description should be addressed in further studies.

The observation that Glunomab staining is strongly increased upon TNF treatment *in vitro* in hCMEC/D3

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

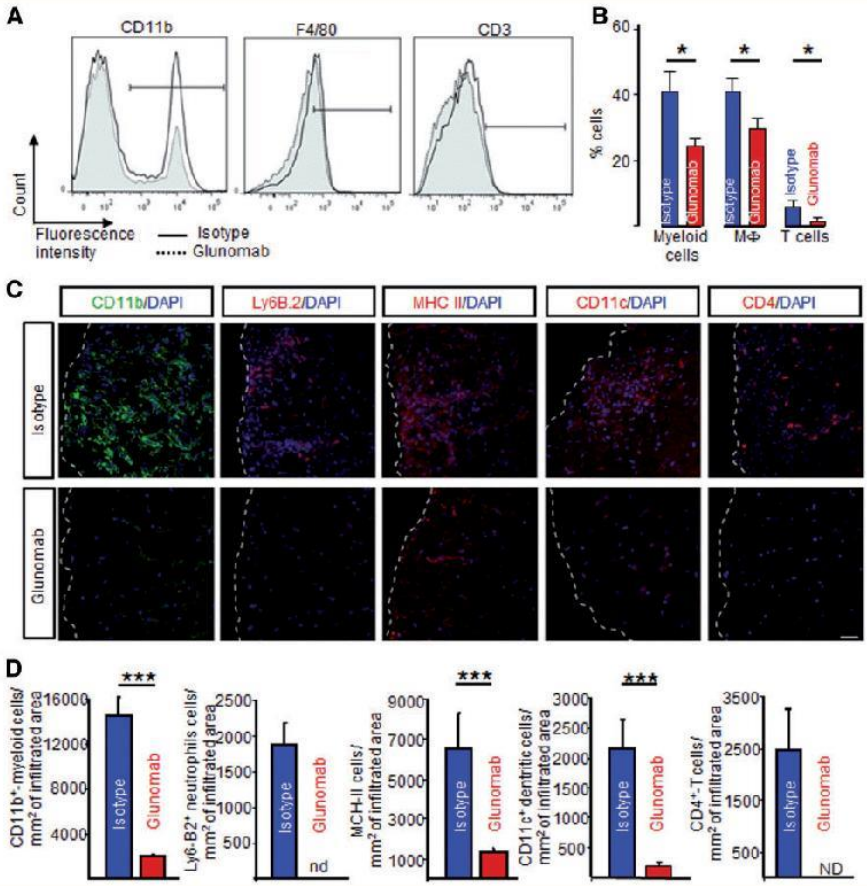


Figure 7 The treatment with Glunomab abolishes immune cell infiltration in the spinal cord of EAE mice. (**A** and **B**) Flow cytometry analysis of immune cell populations within the whole spinal cord from control isotype or Glunomab injected EAE mice 16 days after disease onset (7 days after Glunomab or isotype treatment). Glunomab treatment induced a decrease in the percentage of the whole myeloid ($CD11b^+$), macrophage (MF, $CD11b^+F4/80^+$ cells) and lymphoid ($CD3^+$ T cells) subsets extracted from the spinal cord. (**C**) Photomicrographs show immunostaining in thoracic spinal cords immunolabelled for CD11b (myeloid cells), Ly-6B.2 (neutrophils), MHC-II (antigen presenting cells), CD11c (dendritic cells) and CD4 (T4 lymphocytes). (**D**) Histograms show quantification of cell infiltration in the spinal cord of EAE mice after Glunomab (red bars) or control isotype (blue bars) treatment (expressed in number of cells/mm^2 of infiltrated areas, $n = 6$ mice per group, $^{***}P < 0.001$, ND = non-detected).

cells suggests that NMDAR expression by brain endothelium is upregulated in inflammatory conditions. If this is confirmed by further *in vivo* studies, this would suggest that NMDAR expression on endothelial cells could be part of the endothelium activation that occurs during inflammation, together with the expression of cell adhesion molecules. On a functional point of view, this would mean that NMDAR effects on leucocyte transmigration would be silenced in non-inflammatory conditions and unveiled during inflammation. In addition, endothelial NMDAR expression could also be a marker of endothelial activation during inflammation and could be targeted by diagnostic tools such as molecular MRI for instance.

Another important issue is the origin of the endogenous ligands which activate endothelial NMDAR. Platelets (Tremolizzo *et al.*, 2006), monocytes (Lee *et al.*, 2011) and lymphocytes (Garg *et al.*, 2008) release glutamate. Of note, glutamate plasma levels are elevated in patients with multiple sclerosis, as compared to control patients (Pampliega *et al.*, 2008). These data suggest that leucocyte-derived glutamate could be responsible for NMDAR activation in multiple sclerosis.

Our data suggest that endogenous tPA is involved in the neuroinflammatory processes during EAE. This comes in complement to recent observations of a deleterious, pro-inflammatory effect of exogenously administered tPA in the same model (Wang *et al.*, 2014). Previous studies using tPA knockout mice had described a dual role for endogenous tPA in EAE: tPA was suggested to participate in leucocyte infiltration during the onset and effector phase

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

of EAE (delayed lymphocyte infiltration in tPA knock-out animals) (Cuzner *et al.*, 1996), and to protect axons via parenchymal fibrinolysis during the recovery phase of EAE (fibrin accumulation on damaged axons in tPA knock-out animals) (Akenami *et al.*, 1996). These studies in knock-out animals did not allow discrimination between the multiple effects of tPA, in particular between NMDAR-dependent and NMDAR-independent effects, which can explain the dual effects observed. The strategy used in the present study allows selective blockade of NMDAR- dependent effects of tPA at specific time points of EAE. By using this strategy, we show here that tPA, by acting on NMDAR during the effector phase of EAE, promotes leucocyte infiltration through the blood–spinal cord barrier.

tPA effects on blood–brain barrier function, though never addressed before in multiple sclerosis models, have been previously studied in the context of stroke. In endothelial cells, tPA induces LRP signalling through NF-κB to induce the synthesis of metalloproteinases MMP9 and MMP3, which in turn contribute to blood–brain barrier breakdown and intracranial bleeding (Wang *et al.*, 2003; Suzuki *et al.*, 2009). In parallel, tPA, through LRP shedding (Polavarapu *et al.*, 2007) on perivascular astrocytes, induces the expression of MMP9 (Wang *et al.*, 2006), and promotes the detachment of astrocyte end-feet processes (Polavarapu *et al.*, 2007). Our present results suggest that the mechanisms of action of tPA in EAE differ from what previously described in experimental stroke: in EAE, particularly during the effector phase, tPA would act on endothelial NMDAR to sustain leucocyte infiltration, as it was previously suggested in a cell culture model of blood–brain barrier (Reijerkerk *et al.*, 2010). This difference in the mechanism is consistent with the idea that blood–brain barrier breakdown in stroke and its animal models is different from blood–brain barrier/blood–spinal cord barrier alteration in multiple sclerosis and its animal models, in terms of cause, characteristics, timing, intensity and consequences (Obermeier *et al.*, 2013). Our study shows the relevance of this newly-described mechanism in an appropriate animal model.

Two recent studies allow hypothesizing on the pathway which links tPA, NMDAR and leucocyte transmigration: Wang *et al.* (2014) reported that tPA upregulates ICAM-1 expression in brain endothelial cells through an action dependent on the LRP1 receptor (a tPA receptor); and Mantuano *et al.* (2013) showed that LRP1 associates with NMDAR to trigger cell signalling in Schwann cells. This suggests that in endothelial cells, tPA, through a signalling pathway dependent on the association of LRP1 and NMDAR, could increase the expression of cell adhesion molecules, which would facilitate leucocyte transmigration.

The main described source of tPA is endothelial cells, which suggests that tPA could act in an autocrine fashion on endothelial NMDAR. Another exciting hypothesis is that immune cells could produce tPA during the processes of adhesion/transmigration, which would act as a signal for endothelial cells via endothelial NMDAR. In fact, neutrophils and macrophages have been shown to produce tPA, which in turn can promote their recruitment to the sites of inflammation (Lin *et al.*, 2014; Uhl *et al.*, 2014). In accordance with this, neutrophils have been shown to mediate blood–spinal cord barrier opening in EAE (Aubé *et al.*, 2014). The drastic reduction of immune cell infiltration to the spinal cord of the animals treated with Glunomab, observed in the present study, is in favour of this hypothesis.

Anti-NMDAR antibodies are present in subpopulations of patients with CNS diseases, the prototype of which being anti-NMDAR encephalitis (Dalmau *et al.*, 2008), and are known to be pathogenic in most cases. Nevertheless, Glunomab targets a different region of NMDAR than the epitope targeted in anti-NMDAR encephalitis (N368/G369) (Gleichman *et al.*, 2012). On a functional point of view, antibodies from anti-NMDAR encephalitis patients reduce basal NMDAR function (Mikasova *et al.*, 2012), while Glunomab does not, but rather reduces the potentiation of this response by tPA (Fig. 1A). This absence of effect on basal NMDAR function is likely to impede toxic effects of our antibody on physiological glutamatergic transmission.

The development of this site-specific antibody against the tPA/NMDAR binding site provides hopes for efficient translation to the clinical situation. NMDAR function is crucial for various physiological processes, such as normal synaptic transmission. For that reason, unacceptable side effects have been reported from clinical trials using compounds that fully block NMDAR. Thus, compounds targeting modulatory sites on the NMDAR without affecting basal NMDAR transmission are expected to promote therapeutic effects without the unacceptable side effects. The monoclonal antibody developed in this study fulfils this criterion, as it can block the potentiating effects of tPA on NMDAR, rather than fully inhibit NMDAR-mediated processes. This makes of our novel antibody-based strategy a promising new therapeutic tool for diseases in which tPA/NMDA interactions are causal of tissue damage, including multiple sclerosis.

Acknowledgements

We express our gratitude to Claudine Fauchon and Iris Sánchez for their excellent technical assistance. We deeply thank Dr José Ángel Rodríguez-Alfaro and Dr Javier Mazario for their help with the confocal imaging, and Dr Virgina Vila-del Sol for her help with flow cytometry analysis. We are grateful to Pr Eduardo Soriano for his useful advices concerning Podocalyxin immunostaining.

Funding

This work was funded by the European Union via the FP7 programme, by the *Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques* (ARSEP Special Call

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

"*Immunointervention in demyelinating diseases of the Central Nervous System*") and by the *Fondation pour la Recherche Médicale* (FRM). A.M. is an ITN-Marie Curie fellow (European Union). R.M. received a postdoc fellowship from the *Association pour la Recherche sur la Sclérose en Plaques* (ARSEP). F.L., A.C. and A.F. were financed by the help of the Regional Council of Lower-Normandy (CRBN). M.C.O. was hired under an ARSEP grant. F.d.C. is a CSIC Staff Scientist and received special permission to be hired by the Gobierno de Castilla-La Mancha/SESCAM (Spain). D.C. is hired by the Gobierno de Castilla-La Mancha/SESCAM.

Supplementary material

Supplementary material is available at *Brain* online.

References

Akenami FO, Sirén V, Koskiniemi M, Siimes MA, Teräväinen H, Vaheri A. Cerebrospinal fluid activity of tissue plasminogen activator in patients with neurological diseases. J Clin Pathol 1996; 49: 577–80.

András IE, Deli MA, Veszelka S, Hayashi K, Hennig B, Toborek M. The NMDA and AMPA/KA receptors are involved in glutamate-induced alterations of occludin expression and phosphorylation in brain endothelial cells. J Cereb Blood Flow Metab 2007; 27: 1431–43.

Aubé B, Lévesque SA, Paré A, Chamma É, Kébir H, Gorina R, et al. Neutrophils mediate blood-spinal cord barrier disruption in demyelinating neuroinflammatory diseases. J Immunol 2014; 193: 2438–54.

Basuroy S, Seth A, Elias B, Naren AP, Rao R. MAPK interacts with occludin and mediates EGF-induced prevention of tight junction disruption by hydrogen peroxide. Biochem J 2006; 393: 69–77.

Benchenane K, Castel H, Boulouard M, Bluthé R, Fernandez-Monreal M, Roussel BD, et al. Anti-NR1 N-terminal-domain vaccination unmasks the crucial action of tPA on NMDA-receptor-mediated toxicity and spatial memory. J Cell Sci 2007; 120: 578–85.

Boldyrev AA. Homocysteinic acid causes oxidative stress in lymphocytes by potentiating toxic effect of NMDA. Bull Exp Biol Med 2005; 140: 33–7.

Boldyrev A, Bryushkova E, Mashkina A, Vladychenskaya E. Why is homocysteine toxic for the nervous and immune systems? Curr Aging Sci 2013; 6: 29–36.

Bolton C, Paul C. Glutamate receptors in neuroinflammatory demyelinating disease. Mediators Inflamm 2006; 2006: 93684.

Cammer W, Bloom BR, Norton WT, Gordon S. Degradation of basic protein in myelin by neutral proteases secreted by stimulated macrophages: a possible mechanism of inflammatory demyelination. Proc Natl Acad Sci USA 1978; 75: 1554–8.

Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G, et al. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. J Neuropathol Exp Neurol 1996; 55: 1194–204.

Cuzner ML, Opdenakker G. Plasminogen activators and matrix metalloproteases, mediators of extracellular proteolysis in inflammatory demyelination of the central nervous system. J Neuroimmunol 1999; 94: 1–14.

Dalmau J, Gleichman AJ, Hughes EG, Rossi JE, Peng X, Lai M, et al. Anti-NMDA-receptor encephalitis: case series and analysis of the effects of antibodies. Lancet Neurol 2008; 7: 1091–8.

Docagne F, Muñetón V, Clemente D, Ali C, Loría F, Correa F, et al. Excitotoxicity in a chronic model of multiple sclerosis: neuroprotective effects of cannabinoids through CB1 and CB2 receptor activation. Mol Cell Neurosci 2007; 34: 551–61.

Fernández-Monreal M, López-Atalaya JP, Benchenane K, Cacquevel M, Dulin F, Le Caer J-P, et al. Arginine 260 of the amino-terminal domain of NR1 subunit is critical for tissue-type plasminogen activator-mediated enhancement of N-methyl-D-aspartate receptor signaling. J Biol Chem 2004; 279: 50850–6.

Floris S, Blezer ELA, Schreibelt G, Döpp E, van der Pol SMA, Schadee-Eestermans IL, et al. Blood-brain barrier permeability and monocyte infiltration in experimental allergic encephalomyelitis: a quantitative MRI study. Brain 2004; 127: 616–27.

Garg SK, Banerjee R, Kipnis J. Neuroprotective immunity: T cell-derived glutamate endows astrocytes with a neuroprotective phenotype. J Immunol 2008; 180: 3866–73.

Gleichman AJ, Spruce LA, Dalmau J, Seeholzer SH, Lynch DR. Anti-NMDA receptor encephalitis antibody binding is dependent on amino acid identity of a small region within the GluN1 amino terminal domain. J Neurosci 2012; 32: 11082–94.

Kamat PK, Kalani A, Tyagi SC, Tyagi N. Hydrogen sulfide epigenetically attenuates homocysteine-induced mitochondrial toxicity mediated through NMDA receptor in mouse brain endothelial (bEnd3) cells. J Cell Physiol 2015; 230: 378–94.

Kooij G, Kroon J, Paul D, Reijerkerk A, Geerts D, van der Pol SMA, et al. P-glycoprotein regulates trafficking of CD8(+) T cells to the brain parenchyma. Acta Neuropathol 2014; 127: 699–711.

Lee M, Suk K, Kang Y, McGeer E, McGeer PL. Neurotoxic factors released by stimulated human monocytes and THP-1 cells. Brain Res 2011; 1400: 99–111.

Lin L, Jin Y, Mars WM, Reeves WB, Hu K. Myeloid-derived tissue-type plasminogen activator promotes macrophage motility through FAK, Rac1, and NF-κB pathways. Am J Pathol 2014; 184: 2757–67.

Lopes Pinheiro MA, Kooij G, Mizee MR, Kamermans A, Enzmann G, Lyck R, et al. Immune cell trafficking across the barriers of the central nervous system in multiple sclerosis and stroke. Biochim Biophys Acta 2016; 1862: 461–71

Macrez R, Obiang P, Gauberti M, Roussel B, Baron A, Parcq J, et al. Antibodies preventing the interaction of tissue-type plasminogen activator with N-methyl-D-aspartate receptors reduce stroke damages and extend the therapeutic window of thrombolysis. Stroke 2011; 42: 2315–22.

Manning SM, Talos DM, Zhou C, Selip DB, Park H-K, Park C-J, et al. NMDA receptor blockade with memantine attenuates white matter injury in a rat model of periventricular leukomalacia. J Neurosci 2008; 28: 6670–8.

Mantuano E, Lam MS, Gonias SL. LRP1 assembles unique co-receptor systems to initiate cell signaling in response to tissue-type plasminogen activator and myelin-associated glycoprotein. J Biol Chem 2013; 288: 34009–18.

Mikasova L, De Rossi P, Bouchet D, Georges F, Rogemond V, Didelot A, et al. Disrupted surface cross-talk between NMDA and Ephrin-B2 receptors in anti-NMDA encephalitis. Brain 2012; 135: 1606–21.

Mizee MR, Nijland PG, van der Pol SMA, Drexhage JAR, van Het Hof B, Mebius R, et al. Astrocyte-derived retinoic acid: a novel regulator of blood-brain barrier function in multiple sclerosis. Acta Neuropathol 2014; 128: 691–703.

Moliné-Velázquez V, Cuervo H, Vila-Del Sol V, Ortega MC, Clemente D, de Castro F. Myeloid-derived suppressor cells limit the inflammation by promoting T lymphocyte apoptosis in the spinal cord of a murine model of multiple sclerosis. Brain Pathol 2011; 21: 678–91.

Nicole O, Docagne F, Ali C, Margaill I, Carmeliet P, MacKenzie ET, et al. The proteolytic activity of tissue-plasminogen activator

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

enhances NMDA receptor-mediated signaling. Nat Med 2001; 7: 59–64.

Obermeier B, Daneman R, Ransohoff RM. Development, maintenance and disruption of the blood-brain barrier. Nat Med 2013; 19: 1584–96.

Pampliega O, Domercq M, Villoslada P, Sepulcre J, Rodríguez-Antigüedad A, Matute C. Association of an EAAT2 polymorphism with higher glutamate concentration in relapsing multiple sclerosis. J Neuroimmunol 2008; 195: 194–8.

Paul C, Bolton C. Modulation of blood-brain barrier dysfunction and neurological deficits during acute experimental allergic encephalomyelitis by the N-methyl-D-aspartate receptor antagonist memantine. J Pharmacol Exp Ther 2002; 302: 50–7.

Pitt D, Werner P, Raine CS. Glutamate excitotoxicity in a model of multiple sclerosis. Nat Med 2000; 6: 67–70.

Polavarapu R, Gongora MC, Yi H, Ranganthan S, Lawrence DA, Strickland D, et al. Tissue-type plasminogen activator-mediated shedding of astrocytic low-density lipoprotein receptor-related protein increases the permeability of the neurovascular unit. Blood 2007; 109: 3270–8.

Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SMA, Leyen T, van Het Hof B, Couraud PO, et al. Tissue-type plasminogen activator is a regulator of monocyte diapedesis through the brain endothelial barrier. J Immunol 2008; 181: 3567–74.

Reijerkerk A, Kooij G, van der Pol SMA, Leyen T, Lakeman K, van Het Hof B, et al. The NR1 subunit of NMDA receptor regulates monocyte transmigration through the brain endothelial cell barrier. J Neurochem 2010; 113: 447–53.

Samson AL, Medcalf RL. Tissue-type plasminogen activator: a multifaceted modulator of neurotransmission and synaptic plasticity. Neuron 2006; 50: 673–8.

Scott GS, Bowman SR, Smith T, Flower RJ, Bolton C. Glutamate-stimulated peroxynitrite production in a brain-derived endothelial cell line is dependent on N-methyl-D-aspartate (NMDA) receptor activation. Biochem Pharmacol 2007; 73: 228–36.

Sharp CD, Hines I, Houghton J, Warren A, Jackson TH, Jawahar A, et al. Glutamate causes a loss in human cerebral endothelial barrier integrity through activation of NMDA receptor. Am J Physiol Heart Circ Physiol 2003; 285: H2592–8.

Skerry TM, Genever PG. Glutamate signalling in non-neuronal tissues. Trends Pharmacol Sci 2001; 22: 174–81.

Sulkowski G, Dąbrowska-Bouta B, Chalimoniuk M, Strużyńska L. Effects of antagonists of glutamate receptors on pro-inflammatory cytokines in the brain cortex of rats subjected to experimental autoimmune encephalomyelitis. J Neuroimmunol 2013; 261: 67–76.

Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Kawakami J, Lijnen HR, Umemura K. Tissue-type plasminogen activator (t-PA) induces stromelysin-1 (MMP-3) in endothelial cells through activation of lipoprotein receptor-related protein. Blood 2009; 114: 3352–8.

Tremolizzo L, DiFrancesco JC, Rodriguez-Menendez V, Sirtori E, Longoni M, Cassetti A, et al. Human platelets express the synaptic markers VGLUT1 and 2 and release glutamate following aggregation. Neurosci Lett 2006; 404: 262–5.

Uhl B, Zuchtriegel G, Puhr-Westerheide D, Praetner M, Rehberg M, Fabritius M, et al. Tissue plasminogen activator promotes postischemic neutrophil recruitment via its proteolytic and nonproteolytic properties. Arterioscler Thromb Vasc Biol 2014; 34: 1495–504.

Verkhratsky A, Kirchhoff F. NMDA Receptors in glia. Neuroscientist 2007; 13: 28–37.

Wang J, Zhang X, Mu L, Zhang M, Gao Z, Zhang J, et al. t-PA acts as a cytokine to regulate lymphocyte-endothelium adhesion in experimental autoimmune encephalomyelitis. Clin Immunol 2014; 152: 90–100.

Wang S, Lee S-R, Guo S-Z, Kim WJ, Montaner J, Wang X, et al. Reduction of tissue plasminogen activator-induced matrix metalloproteinase-9 by simvastatin in astrocytes. Stroke 2006; 37: 1910–12.

Wang X, Lee S-R, Arai K, Lee S-R, Tsuji K, Rebeck GW, et al. Lipoprotein receptor-mediated induction of matrix metalloproteinase by tissue plasminogen activator. Nat Med 2003; 9: 1313–17.

Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, Charneau P, Holloway K, Leveque M, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. FASEB J 2005; 19: 1872–74.

Downloaded from http://brain.oxfordjournals.org/ by guest on July 20, 2016

Leonetti *et al. Molecular Neurodegeneration* (2017) 12:20
DOI 10.1186/s13024-017-0160-5

Molecular Neurodegeneration

RESEARCH ARTICLE Open Access

Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination

Camille Leonetti[1], Richard Macrez[1], Mathilde Pruvost[1], Yannick Hommet[1], Jérémie Bronsard[1], Antoine Fournier[1], Maxime Perrigault[1], Isabel Machin[2,3], Denis Vivien[1], Diego Clemente[2,3], Fernando De Castro[2,4], Eric Maubert[1†] and Fabian Docagne[1,5*†]

Abstract

Background: The ability of oligodendrocyte progenitor cells (OPCs) to give raise to myelin forming cells during developmental myelination, normal adult physiology and post-lesion remyelination in white matter depends on factors which govern their proliferation, migration and differentiation. Tissue plasminogen activator (tPA) is a serine protease expressed in the central nervous system (CNS), where it regulates cell fate. In particular, tPA has been reported to protect oligodendrocytes from apoptosis and to facilitate the migration of neurons. Here, we investigated whether tPA can also participate in the migration of OPCs during CNS development and during remyelination after focal white matter lesion.

Methods: OPC migration was estimated by immunohistological analysis in spinal cord and corpus callosum during development in mice embryos (E13 to P0) and after white matter lesion induced by the stereotactic injection of lysolecithin in adult mice (1 to 21 days post injection). Migration was compared in these conditions between wild type and tPA knock-out animals. The action of tPA was further investigated in an in vitro chemokinesis assay.

Results: OPC migration along vessels is delayed in tPA knock-out mice during development and during remyelination. tPA enhances OPC migration via an effect dependent on the activation of epidermal growth factor receptor.

Conclusion: Endogenous tPA facilitates the migration of OPCs during development and during remyelination after white matter lesion by the virtue of its epidermal growth factor-like domain.

Keywords: Multiple sclerosis, Myelin, Epidermal growth factor, Endothelial cells, Vasophilic migration, Lysolecithin, Spinal cord, Development

Background

Spontaneous remyelination enables regeneration of white matter after lesions. This process is possible thanks to the presence, in the adult central nervous system (CNS), of oligodendrocyte precursor cells (OPCs) which have the capacity to replace dead oligodendrocytes and to form new myelin sheaths at the sites of demyelination [1]. Spontaneous remyelination is linked to the ability of OPCs to proliferate, migrate and differentiate into mature oligodendrocytes in physiological conditions (during development and in adulthood) and in response to injuries.

This process is important in various pathological situations in the CNS, including multiple sclerosis (MS). In relapsing-remitting MS (RR-MS), the most frequent form of the disease, patients experience successive phases of relapses (worsening of symptoms) and remissions (neurological improvement), which are

* Correspondence: docagne@cyceron.fr
†Equal contributors
[1]Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1237, Physiology and imaging of neurological disorders (PhIND), Cyceron, Caen 14000, France
[5]Inserm, Centre Cyceron, Bvd Becquerel, BP5229, Caen Cedex 14074, France
Full list of author information is available at the end of the article

BioMed Central

© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.

considered to mostly follow a pattern of successive demyelination and remyelination, giving rise to the so-called 'shadow plaques'. However, the extent of remyelination is very variable among patients, and, in most cases, incomplete [2, 3]. A second form of MS exists, called primary progressive MS (PP-MS), in which the disease progresses gradually without remission phases. Finally, in a significant subset of RR-MS patients, the course of the disease eventually shifts to a progressive course, termed secondary progressive MS (SP-MS). In these progressive forms of MS (PP-MS and SP-MS), although partial remyelination has been observed [4], its efficiency is not sufficient for counterbalance the progression of disease. Therefore, there is great interest in understanding the endogenous factors which govern spontaneous remyelination in order to explain why this process fails in the different forms of MS. This better knowledge could help designing new therapeutic strategies aiming at boosting the capacity of remyelination in MS and other demyelinating diseases [5, 6].

Most remyelinating oligodendrocytes are derived from adult OPCs, which have a widespread distribution throughout the CNS [7]. Effective remyelination depends in great part on the ability of these OPCs to reach the demyelinated areas. Migration of OPCs depends on the action of chemotactic factors able to attract or repulse OPCs, thus controlling the direction of migration, and chemokinetic factors able to accelerate or slowdown OPCs, thus controlling the speed of migration [8]. Although embryonic OPCs, responsible for myelination during development, and adult OPCs, responsible for remyelination after lesion, form two distinct populations, developmental myelination and post-lesion remyelination share mechanistic aspects [9, 10]. For this reason, lessons learned from the description of myelination during development can be useful to better understand the chemotactic and chemokinetic factors involved in remyelination.

Tissue-type plasminogen activator (tPA) is a serine protease long described for its role in fibrinolysis in the circulation. Beyond this property, tPA has been reported to be expressed by many cell types in the brain, including oligodendrocytes [11, 12] and to exert multiple functions in the healthy and diseased CNS [13]. Among these functions, tPA has been shown to facilitate neuron migration during development [14]. tPA has also been shown to influence neuron and OPC survival, in particular by exerting anti-apoptotic effects on these cells via the action of a structural domain homologous to epidermal growth factor (EGF) [11, 15], a growth factor previously described to increase OPC migration [16]. However, whether tPA could influence OPC migration was never investigated so far.

In the present study, we hypothesized that tPA could facilitate OPC migration based on the following facts described above: (i) tPA facilitates neuronal migration [14], (ii) tPA can act on OPCs through its EGF-like domain [11] and (iii) EGF increases OPC migration [16]. To study this, we first explored the migration of OPCs in the developing spinal cord and telencephalon (giving raise to corpus callosum, the vastest white matter area in murine brain) by comparing wild type (WT) and tPA knock-out ($tPA^{-/-}$) animals. Because we observed a delay in OPC migration during myelination, we studied whether a similar phenotype could appear in adult $tPA^{-/-}$ mice after focal white matter lesion. Indeed, remyelination was also delayed in these animals, indicating that endogenous tPA could facilitate OPC migration. Finally, we show here that tPA exerts a chemokinetic effect on OPCs in vitro, through its domain of homology with EGF.

Methods

Ethical statement

Experiments were performed in our laboratory (agreement number D14118001) in accordance with French ethical laws (act no. 87–848; *Ministère de l'Agriculture et de la Forêt*), European Union Council Directives of November 24, 1986 (2010/63/EEC) and guidelines for the care and use of laboratory animals. Experiments have been approved by the ethics committee n°52 on animal experiments (CENOMEXA) and by the French Ministry of Research under the project license number 02653.2 (30/06/2016). None of the experimental procedures induced animal mortality. All experiments were performed following the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk), including randomization of treatment as well as analysis blind to the treatment.

Animals and surgery

Wild type and $tPA^{-/-}$ [17] C57BL6-J mice (aged 2 months, CURB, Caen, France) were housed in a temperature-controlled room on a 12 h light/12 h dark cycle with access to food and water ad libitum. Demyelination was induced by stereotaxic injection of 1% LPC (L1381, Sigma-Aldrich) in 0.1 M phosphate-buffered saline (Sigma-Aldrich). Mice were deeply anaesthetized with isoflurane (induction 5%, maintenance 2.5% in 70/30% NO_2/O_2). Rectal temperature was maintained at 37 °C using a feedback-regulated heating pad. Mice were placed in a stereotaxic frame. The demyelinating agent was injected unilaterally into the corpus callosum with a microinjection pipette (Hecht Assistent), using the following stereotaxic coordinates: 1.1 mm anterior to the bregma, 2.7 mm lateral to the bregma and 1.3 mm deep from the cortex surface, using an angle of 30°. Scalp incisions were closed with Vetbond thread.

Magnetic resonance imaging (MRI) analysis

MRI analyses were performed on 1, 3, 7, 14 and 21 days post-injection. Experiments were carried out on a Pharmascan 7 T MRI (Bruker, Germany). T2-weighted images were acquired using a multislice/multiecho sequence: TE/TR 12.7 ms/2500 ms and a flip angle of 180° with spatial resolution of 70 μm*70 μm and slice thickness 350 μm interpolated to an isotropic resolution of 70 μm (acquisition time = 8 min). Lesion sizes were quantified on these images by an experimenter blinded to the genotype using ImageJ (NIH software v1.49e, National Institute of Health, Bethesda, MD, USA).

Immunohistochemistry

1, 3, 7, 14 and 21 days post-injection mice were deeply anesthetized and perfused transcardially with 20 ml of cold heparinized NaCl 0.9%, followed by 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid in 150 ml of 0.1 M sodium phosphate buffer, pH 7.4. Brains were removed, washed in veronal buffer containing 20% sucrose, and frozen in Tissue-Tek (Miles Scientific). Embryos were collected at noon of embryonic days. Heads and trunks were fixed in 2% paraformaldehyde and 0.2% picric acid for 24 h, cryoprotected in veronal buffer containing 20% sucrose, and frozen in Tissue-Tek. Cryomicrotome-cut sections (10 μm) were collected on poly-lysine slides and stored at −80 °C before processing. Sections were incubated overnight at room temperature with a primary antibody or a cocktail of primary antibodies (Additional file 1: Table S1) diluted in veronal buffer containing 0.25% Triton ×100. Three rinses were performed in veronal buffer at room temperature. All secondary antibodies (Additional file 1: Table S1) were diluted (1:600) in veronal buffer containing 0.25% Triton × 100. Incubation was performed at room temperature for 1h30min followed by three washes. Washed sections were coverslipped with antifade medium containing DAPI. For each set of immunostaining, the following controls were systematically performed on adjacent sections: Omission of primary or secondary antibodies in single immunolabelling experiments resulted in no specific labelling. Additionally, the absence of cross-reactivity between the antibodies in multi-immunolabelling experiments was demonstrated by omission of one of the primary antibodies and consecutively the absence of relevant signal detection with the cocktail of secondary antibodies.

Images were digitally captured using a Leica DM6000B microscope-coupled coolsnap camera (ORCA Flash 4-LT; Hamamatsu), visualized with Metamorph 5.0 software (Molecular Devices) and further processed using ImageJ1.5 h software (NIH).

3D reconstruction

Images were collected using a Leica SP5 confocal microscope with a 100× oil-immersive objective (Leica Microsystems). Confocal images were taken at a 1024 × 1024 pixel resolution with a z-step of 0.45 μm. The 3D structure was reconstructed from confocal images using Imaris software (version 5.5, Bitplane, Zurich, Switzerland). Volume and surface functions were used.

Cell counting and quantification of MBP immunofluoresence

The total number of positive cells was counted in the lesion area. In the contralateral corpus callosum, an equivalent area for each mice was selected and the number of positive cells was counted in the selected area. During development, the area of the whole spinal cord or telencephalon section was measured and the total number of positive cells was counted in the section. For MBP immunofluorescence quantification, the mean gray value was evaluated in the lesion area or the equivalent contralateral area. All quantitative analyses were done in three randomly selected sections per mouse and the individual values for the number of cells/mm^2 or for fluorescence intensity for each mouse was estimated by averaging the values of all counted sections for the same mouse.

Oligodendrocyte precursor cell (OPC) cultures

Primary mixed glial cultures were prepared according to the modified technique of McCarthy and de Vellis [18]. Briefly, forebrains of P_0-P_1 newborn Wistar rats were dissociated mechanically and resuspended in DMEM (D5671, Sigma-Aldrich) containing 10% fetal bovine serum, 10% horse serum, 2 mM glutamine (25030024, Thermo Fisher Scientific), 0.5% penicillin streptomycin (15140122, Thermo Fisher Scientific) and plated on poly-D-lysine-coated (0.1 mg/mL) (P6407, Sigma-Aldrich) 75 cm^2 flasks (Nunc, Wiesbaden, Germany). After 10 days in culture the flasks were shaken at 210 rpm at 37 °C for 3 h to remove loosely adherent microglia. The remaining OPCs present on the top of the confluent monolayer of astrocytes were dislodged by shaking overnight at 270 rpm. The cell suspension was filtered through a 40 μm nylon mesh and then pre-plated on bacterial grade Petri dishes for 1 h. The nonadherent OPCs that remained in suspension were recovered, filtered through a 40 μm nylon mesh, and plated again on bacterial grade Petri dishes for 30 min. The resulting enriched OPCs cell suspension was counted and seeded in accordance to the assay performed.

Cell proliferation assay

OPC proliferation was estimated by examination of the cultures under bright-field microscopy and quantified with WST-1 assay. Briefly, oligodendrocyte precursor cell were plated on poly-D-lysine-coated (0.1 mg/mL),

24-well (2 cm^2/well) tissue culture dish at a density of 6×10^4 cells/cm^2 and cultured in DMEM (D5671, Sigma-Aldrich) supplemented with recombinant PDGF-AA (PHG0035, Thermo Fisher Scientific, 5 ng/ml) and bFGF (15140–122, Invitrogen, 5 ng/ml), N2 supplement (17502–048, Thermo Fisher Scientific), 2 mM glutamine (25030024, Thermo Fisher Scientific), 0.5% penicillin streptomycin (15140122, Thermo Fisher Scientific). Cells were used for proliferation assay at 2 days in vitro. To assess cell proliferation, WST-1 reagent (Roche Applied Science, Indianapolis, IN), a tetrazolium salt, was added to the medium and incubated for 1 h at 37 °C in 5% CO_2. After WST-1 incubation with cells, bathing media from 24-well plates was transferred into 96-plates and cell proliferation was determined by measuring the absorbance at 460 nm (reference wavelength 600 nm) for cleavage of the tetrazolium salt to formazan. A portion of the wells were used to evaluate the number of cells at the beginning of the experiment (t0 value), by adding WST-1 directly to the medium of 3 wells. Other wells were treated with tPA, vehicle or control medium by renewing medium. After 24 h of treatment, cells were incubated with WST-1 to estimate the number of cells after treatment (t1 value). Percentage of proliferation during 24 h (with or without treatment) was calculated using the following formula: [% of proliferation = ((t1 value/t0 value) × 100)-100].

Chemokinesis assay and immunocytochemistry

OPC migration was assessed in chemotaxis chambers with polycarbonate membranes (pore size 8 μm; Corning Costar). The membranes were coated with poly-L-lysine (0.1 mg/mL) and laminin (0.1 mg/mL) (23017015, Thermo Fisher Scientific) as described previously [19]. OPCs from rat were seeded (40000 cells/transwell) in the upper chamber while in the lower compartment the DMEM culture medium containing N2 supplement, 2 mM glutamine, penicillin streptomycin was supplemented for the different experimental groups as follows: Control; FGF2 (0.2 μg/mL; RD Systems 233-FB); tPA 0.1, 1, 10 μg/mL (Actilyse; BoehringerIngelheim); tPA buffer (vehicle); tPA 10 μg/mL + inhibitor of EGFR kinase, AG1478 (5 μM; 1276, Tocris); AG1478 (5 μM); tPA GGACK 10 μg/mL. Concerning experimental groups, tPA 10 μg/mL + AG1478 5 μM and AG1478 5 μM, the cells were also treated one hour before and during the experiment with the EGFR blocker AG1478 5 μM and the rest of the cultures were exposed to an equal volume of the vehicle DMSO (Sigma-Aldrich-Aldrich) during the course of the experiment which was carried out at 37 °C, 5% CO_2, and at 95% relative humidity. After 24 h, cells were fixed with 4% paraformaldehyde (PFA; for 10 min at RT), washed 3 times with phosphate buffer saline (PBS, pH 7.4) and the non-migratory cells on the upper membrane surface were removed with a cotton swab. The presence of transmigrated OPCs in the lower chamber was evaluated by immunostaining with Olig2 antibody (1:200, AB9610 Millipore) and its corresponding fluorescent secondary antibody. After immunostaining, the Boyden filters were examined and images were digitally captured using a Leica DM6000 microscope-coupled coolsnap camera and visualized with Metamorph 5.0 software (Molecular Devices). To quantify chemokinesis, 16 fields per well (×20 objective) taken randomly were photographed and the number of transmigrated OPCs per field was counted using ImageJ 1.49e software (NIH). The data were expressed as number of migrating OPCs per $mm^2 \pm$ standard error to the mean (SEM).

Production of proteolytically inactive tPA (GGACK tPA)

GGACK (1,5-dansyl-L-glutamyl-L-glycyl-L-arginine chloromethylketone; EMD) was added to Actilyse (Boehringer-Ingelheim) in a fourfold molar excess. The solution was allowed to react for 24 h at room temperature and dialysed for 48 h at 4 °C with PBS to remove all unbound GGACK. The actilyse buffer was reconstituted with arginine monohydrochloride (Sigma-Aldrich-Aldrich) added to GGACK-tPA. Finally, the lack of proteolytic activity of GGACK-tPA was confirmed with a spectrozyme assay (American Diagnostica).

Immunoblotting

After dissociation with ice-cold TNT buffer (50 mM Tris–HCl pH 7.4; 150 mM NaCl; 0.5% Triton X-100), cells were centrifuged (12,000 g, 4 °C, 15 min) and protein content assessed by the BCA method (Pierce, France). Proteins (20 μg) were separated by 10% SDS-PAGE and transferred onto a PVDF membrane. Membranes were blocked with TBS (10 mM Tris; 200 mM NaCl; pH 7.4) containing 0.05% Tween-20, 5% BSA, and incubated overnight at 4 °C with primary antibodies against Erk 1/2 (42 kDA) and phosphorylated Erk 1/2 (42 kDA) (Cell signaling). After incubation with the anti-rabbit peroxydase-conjugated secondary antibodies (1:50000), proteins were visualized with an enhanced chemiluminescence ECL-Plus detection system (Perkin ElmerNEN, France).

Statistical analysis

All results are expressed as mean ± SEM. For in vitro experiments, the n value corresponds to n different well pools derived from independent dissections. For group comparison, Kruskal-Wallis tests were used followed by Mann–Whitney U-tests as post hoc tests.

Results

Migration of OPC is delayed in tPA$^{-/-}$ mice during spinal cord and corpus callosum development

Our first step was to estimate the effects of the invalidation of tPA gene on ventral OPCs migration during spinal cord development (Fig. 1). The ventral OPCs originate from the motor neuron progenitor (pMN) domain that first produces motor neurons followed by OPCs [20]. We observed a lower number of Olig2$^+$ cells in the spinal cord parenchyma, outside the pMN domain, in tPA$^{-/-}$ mice than in wild type mice at E13 (WT: 117.61 ± 5.34 vs tPA$^{-/-}$: 44.90 ± 8.87, $p = 0.0339$), E15 (WT: 342.67 ± 5.69 vs tPA$^{-/-}$: 276.62 ± 16.41, $p = 0.0339$) and E17 (WT: 2517.52 ± 107.76 vs tPA$^{-/-}$: 1990.55 ± 109.47, $p = 0.0209$) (Fig. 1a and corresponding quantifications, Fig. 1b). There was no significant difference between wild type and tPA$^{-/-}$ mice at P0 (WT: 1957.72 ± 46.20 vs tPA$^{-/-}$: 2216.869 ± 167.66, $p = 0.1489$) (Fig. 1a and corresponding quantifications, Fig. 1b). Conversely, a higher number of Olig2$^+$ OPCs remained in the pMN domain, in tPA$^{-/-}$ mice than in wild type mice at E13 (WT: 4854.75 ± 345.08 vs tPA$^{-/-}$: 5889.12 ± 30.20, $p = 0.0339$) (Fig. 1c and corresponding quantification, Fig. 1d). There was no significant difference between wild type and tPA$^{-/-}$ mice at E15 (WT: 2632.84 ± 192.33 vs tPA$^{-/-}$: 2230.11 ± 202.74, $p = 0.4795$). Olig2$^+$ cells were not detected inside the pMN domain at E17 and P0, (Fig. 1c and corresponding quantifications, Fig. 1d). This effect was not due to an action of tPA on OPC proliferation, as the number of Ki67$^+$/Olig2$^+$ proliferating OPCs was not

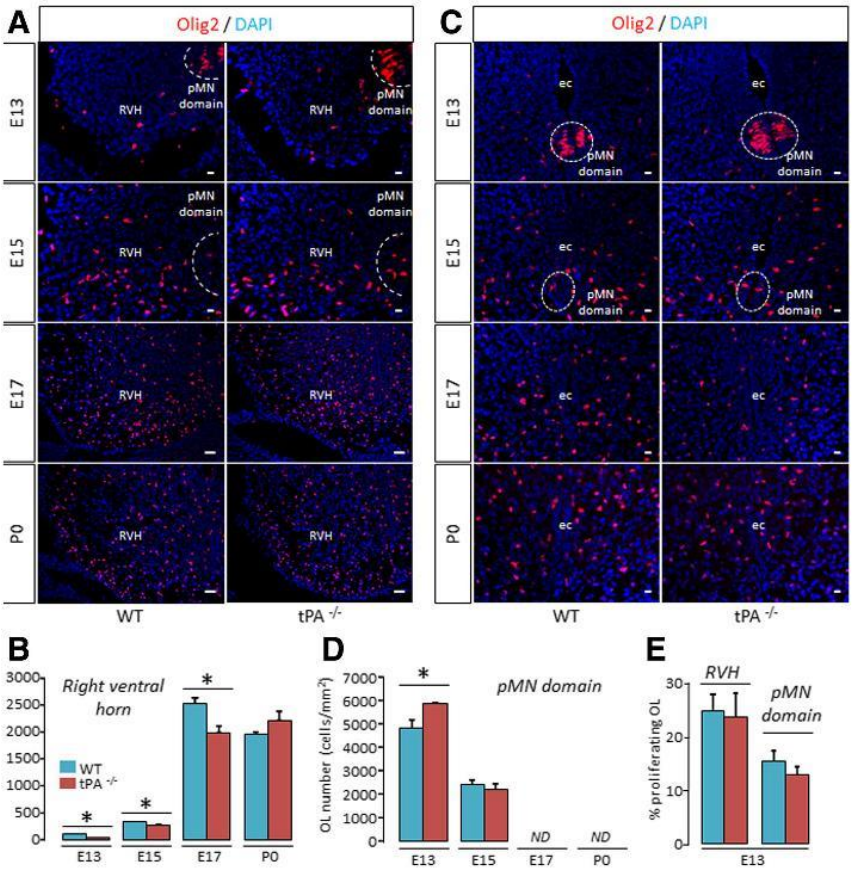


Fig. 1 *Migration of OPC is delayed in tPA$^{-/-}$ mice during spinal cord development.* **a** Photomicrographs from spinal cord sections show representative images (from 3–4 mice) of Olig2 immunostaining (*red*) and DAPI staining (*blue*) in the spinal cord (*right ventral horn*) of WT (left column) and tPA$^{-/-}$ (*right column*) mice at E13, E15, E17 and P0. **b** Corresponding quantifications of Olig2$^+$ oligodendrocytes (mean ± SEM, $n = 3$–4 per group; *$p < 0.05$). **c** Photomicrographs from tissue sections show representative images (from 3–4 mice) of Olig2 immunostaining (*red*) and DAPI staining (*blue*) in pMN domain of WT (*left column*) and tPA$^{-/-}$ (*right column*) mice at E13, E15, E17 and P0. **d** Corresponding quantifications of Olig2$^+$ oligodendrocytes (mean ± SEM, $n = 3$–4 per group; *$p < 0.05$). **e** Quantification of the percentage of proliferating OLs (Ki67$^+$/Olig2$^+$) in the spinal cord parenchyma (*right ventral horn* and *pMN domain*) (mean ± SEM, $n = 3$–4 per group). *E: embryonic day; ec: ependymal canal; ND: not detected; OL: oligodendrocyte; P: postnatal day; pMN domain: motor neuron progenitor domain; RVH: right ventral horn; WT: wild type. tPA$^{-/-}$: tPA Knock-out.* Scale bars: 20 μm

altered in tPA$^{-/-}$ mice, either within or outside the pMN at E13 (Fig. 1e). These data suggest that the lower number of OPCs outside the pMN observed in the spinal cord of tPA$^{-/-}$ mice is due to a delay in the migration ability of OPCs. We then asked whether this effect of tPA is restricted to the spinal cord or could also be important for the development of other brain regions. To answer this, we used the same strategy as before to assess OPC migration in the telencephalon of mice between E15 and P0 (Fig. 2), at stages of corpus callosum formation. In accordance with what observed in the spinal cord, we observed a lower number of Olig2$^+$ cells in the telencephalon parenchyma in tPA$^{-/-}$ mice as compared to wild type mice at E15 (WT: 179.21 ± 22.48 vs tPA$^{-/-}$: 120.54 ± 2.49, p = 0.0495) and E17 (WT: 342.73 ± 42.56 vs tPA$^{-/-}$: 232.22 ± 13.35, p = 0.0495) (Fig. 2a and corresponding quantifications, Fig. 2b). At P0, this wave of OPC migration stopped, as reflected by a decrease in the number of Olig2$^+$ both in wild type and tPA$^{-/-}$ animals. This trend occurred with a delay in tPA$^{-/-}$, resulting in a higher number of Olig2$^+$ cells in tPA$^{-/-}$ at P0 (WT: 114.82 ± 9.48 vs tPA$^{-/-}$: 151.13 ± 9.20 p = 0.0495). Together, these data show that tPA deletion leads to a delay in the migration of OPCs during the formation of the spinal cord and the corpus callosum.

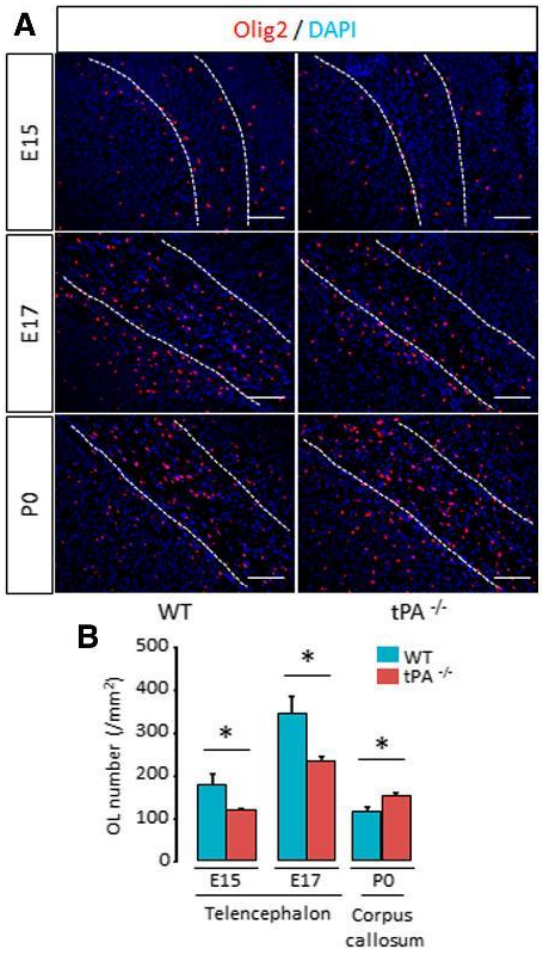


Fig. 2 *Migration of OPC is delayed in tPA$^{-/-}$ mice during corpus callosum development.* **a** Photomicrographs from tissue sections show representative images (from 3 mice) of Olig2 immunostaining (*red*) and DAPI staining (*blue*) in the telencephalon of WT (*left column*) and tPA$^{-/-}$ (*right column*) mice during corpus callosum development at E15, E17, P0 and P3. Dotted lines show corpus callosum limits. **b** Corresponding quantifications of Olig2$^+$ oligodendrocytes (mean ± SEM, $n = 3$ per group; $^*p < 0.05$). *E: embryonic day; OL: oligodendrocyte; P: postnatal day; WT: wild type.* Scale bars: 100 μm

Our next step was to determine the cellular origin of tPA during development in wild type mice (Fig. 3). tPA expression in mature oligodendrocytes did not occur before P0 (Fig. 3a), confirming previous reports in adult mice [11]. However, tPA was expressed in Sox2$^+$ neural stem cells of the pMN (Fig. 3b) and in CD31$^+$ endothelial cells (Fig. 3c) within the whole spinal cord from the early stages of spinal cord development (E13) to P0. Then, because OPC migration has been shown to be guided by endothelial cells during development [21], we hypothesized that invalidation of tPA may result in loss of OPC tropism for endothelial cells. We focused on embryonic day 13 to study oligovascular interactions because E13 signs the beginning of the first wave of OPC migration in the mouse spinal cord [22] and because the biggest difference in oligodendrocyte migration between wild type and tPA$^{-/-}$ were observed at this stage (Fig. 1a-b). First, in the right ventral horn of spinal cord in wild type mice, we observed that a substantial proportion of Olig2$^+$ cells (Fig. 4a) was found at the vicinity (<10 μm) of vessels at E13. In tPA$^{-/-}$ mice, we found significantly less OPCs at the vicinity of vessels than in wild type mice (WT: 38.86 ± 2.02 vs tPA$^{-/-}$: 31.33 ± 1.25, $p = 0.0495$) (Fig. 4b, and corresponding quantification Fig. 4c). Of note, the number of vessels was not altered in tPA$^{-/-}$ mice as indicated by quantification of the surface occupied by CD31 immunostaining (WT: 3.76 ± 015 vs tPA$^{-/-}$: 3.79 ± 0.13, $p = 0.8273$) (Fig. 4d).

Migration of OPC is delayed in tPA$^{-/-}$ mice during remyelination after white matter lesion in adult mice

Because remyelination after lesion of the white matter shares mechanistic features with myelination during development [9, 10], we then addressed the possible involvement of tPA in remyelination. To do so, we induced focal white matter lesions in adult mice by stereotactic injection of lysolecithin directly in the corpus callosum [23]. As seen with MRI analysis, this induced the formation of a white matter lesion (Fig. 5a), followed by progressive recovery along time from 3 to

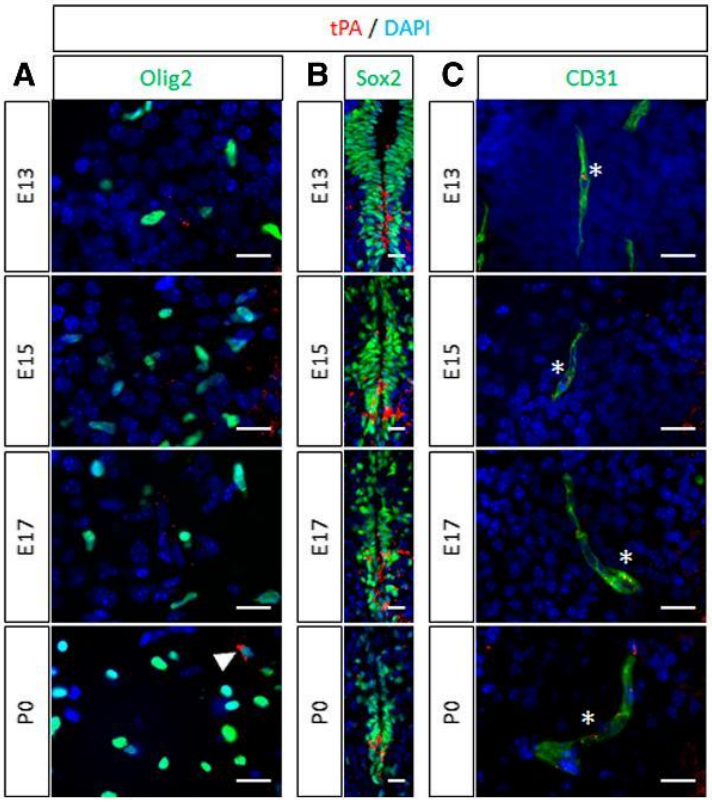


Fig. 3 *tPA expression during spinal cord development*. Photomicrographs from spinal cord sections show representative images (from 3 mice) of tPA (*red*) with (**a**) Olig2 (*green*), (**b**) Sox2 (*green*), and (**c**) CD31 (*right column, green*) immunostaining in the spinal cord of wild type mice at E13, E15, E17 and P0. Asterisks show colocalization of tPA and CD31 immunoreactivity in endothelial cells. Filled arrowhead shows colocalization of tPA and Olig2 immunoreactivity oligodendrocytes. *E: embryonic day; P: postnatal day*. Scale bars: 20 μm

21 days post injection (dpi) (Fig. 5a and corresponding quantification, Fig. 5b). At 3 dpi, $tPA^{-/-}$ presented larger lesions than wild type mice (WT: 0.71 ± 0.05 mm^3 vs $tPA^{-/-}$: 1.18 ± 0.13 mm^3, $p = 0.009$) (Fig. 5a and corresponding quantification, Fig. 5b). However, at 1dpi, lesion size was equivalent in wild type and $tPA^{-/-}$ animals (WT: 0.78 mm^3 ± 0.09 vs $tPA^{-/-}$: 0.91 ± 0.05 mm^3, $p = 0.1745$) (Fig. 5a and corresponding quantification, Fig. 5b) which indicates that the larger lesions in $tPA^{-/-}$ at 3 dpi are due to a prolonged progression of the lesion. In fact, at 3 dpi, recovery had already started in wild type animals, while the lesion continued growing in $tPA^{-/-}$ animals (Fig. 5a and corresponding quantification, Fig. 5b). White matter lesions were still larger in $tPA^{-/-}$ at 7 dpi (WT: 0.49 mm^3 ± 0.08 vs $tPA^{-/-}$: 0.82 mm^3 ± 0.09, $p = 0.0283$) (Fig. 5a and corresponding quantification, Fig. 5b), to eventually reach equivalent size a 14 dpi (WT: 0.5 ± 0.07 vs $tPA^{-/-}$: 0.49 ± 0.12, $p = 0.9168$). This suggests a delayed recovery in $tPA^{-/-}$ animals, which could be due to a defect in OPC migration. Indeed, we observed that the number of $Olig2^+$ cells was lower in $tPA^{-/-}$ at 3dpi, 7dpi and 14 dpi, and reached equivalent values at 21dpi (WT: 0.41 ± 0.11 vs $tPA^{-/-}$: 0.34 ± 0.04, $p = 0.7540$) (Fig. 5c and corresponding quantification, Fig. 5d). This effect was not due to an action of tPA on OPC proliferation, as the number of $Ki67^+/Olig2^+$ proliferating OPCs was not altered in $tPA^{-/-}$ at 3dpi (Fig. 5e). No difference was observed in the number of $Olig2^+$ cells in the contralateral corpus callosum at these times (Additional file 2: Figure S1). We asked whether these differences in the number of $Olig2^+$ cells within the lesion could result in differences in remyelination. At 14 dpi, wild type and $tPA^{-/-}$ corpus callosum showed comparable MBP staining with a remaining lesion in the ipsilateral corpus callosum (WT: 2110.94 ± 79.37 vs $tPA^{-/-}$: 2143.10 ± 354.94, $p = 0.8273$) (Fig. 5f and corresponding quantification, Fig. 5g), indicating that remyelination was incomplete in wild type and $tPA^{-/-}$ animals at this stage. At 21dpi, in wild type animals, MBP staining increased in the ipsilateral to reach an intensity close to the contralateral, unlesioned hemisphere, and the lesion mostly disappeared (Fig. 5f and corresponding quantification of MBP staining,

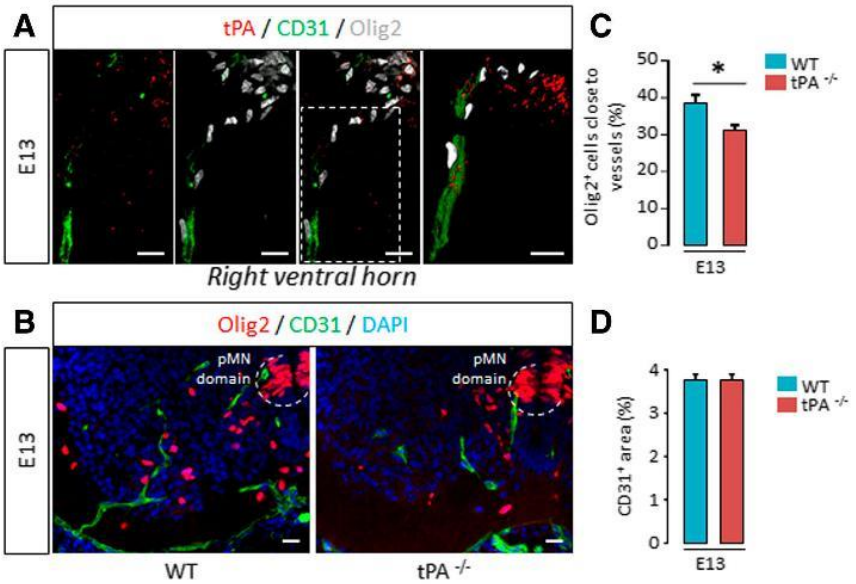


Fig. 4 *tPA promotes oligodendrocyte migration along vessels during development at times of intense migration.* **a** Photomicrographs from spinal sections show representative images (from 3 mice) of tPA (*red*), CD31 (*green*) and Olig2 (*grey*) immunostaining in the right ventral horn of WT mice spinal cords at E13. Right image is a 3D reconstruction from confocal acquisitions (on the left). **b** Photomicrographs from tissue sections show representative images (from 3 mice per group) of Olig2 (*red*), CD31 (*green*), and DAPI (*blue*) immunostaining in the right ventral horn of WT and $tPA^{-/-}$ mice spinal cords at E13. **c** Quantification of the percentage of $Olig2^+$ oligodendrocytes close (<10 μm) to vessels in the ventral spinal cord parenchyma outside the pMN domain in WT and $tPA^{-/-}$ mice (mean ± SEM, $n = 3$ per group; $*p < 0.05$). **d** Quantification of the percentage of $CD31^+$ staining area in the ventral spinal cord parenchyma outside the pMN domain in WT and $tPA^{-/-}$ mice (mean ± SEM, $n = 3$ per group; $*p < 0.05$). *E: embryonic day; OL: oligodendrocyte; pMN domain: motor neuron progenitor domain; WT: wild type.* Scale bars: 20 μm

Fig. 5g), which indicates effective remyelination between 14 and 21 dpi. In contrast, in $tPA^{-/-}$ animals, MBP staining did not increase between 14 and 21 dpi and a lesion remained in the corpus callosum (Fig. 5f and corresponding quantification of MBP staining, Fig. 5g), which indicates that remyelination was mostly ineffective between 14 and 21 dpi. Together, these data show that the delay in OPC migration in $tPA^{-/-}$ is associated to a defect in remyelination.

We next addressed the question of the cellular origin of tPA during post-lesion remyelination (Fig. 6). tPA expression was found around the lesion in wild type mice in endothelial $CD31^+$ cells and in some $Olig2^+$ oligodendrocytes at all tested stages (1–21 dpi), but not in $Iba1^+$ or $GFAP^+$ cells (Fig. 6). Similar to what previously observed during developmental myelination, oligodendrocyte migration took place preferentially along the vessels (Fig. 7a) at 3 dpi and this tropism of oligodendrocyte for vessels was reduced in $tPA^{-/-}$ mice as compared to wild type mice (WT: 25.57 ± 2.39 vs $tPA^{-/-}$: 15.51 ± 3.79, $p = 0.0495$) (Fig. 7b and corresponding quantification of MBP staining, Fig. 7c). As previously observed during developmental myelination, the area of $CD31^+$ staining was equivalent in the lesion in wild type and $tPA^{-/-}$ mice (WT: 1.52 ± 0.27 vs $tPA^{-/-}$:1.21 ± 0.07, $p = 0.5127$) (Fig. 7d), indicating that the number of vessels was not altered in $tPA^{-/-}$ animals.

tPA exerts chemokinetic effects via its EGF-like domain

The above data show that the loss of tPA drives a delay in developmental myelination and in remyelination after white matter lesion. This suggests that endogenously produced tPA participates in promoting (re)myelination. To confirm that tPA could drive this effect by promoting the migration of OPCs, we used an in vitro system designed to assess chemokinesis of cultured OPCs (Fig. 8). We showed that tPA promoted the migration of OPCs in a dose dependent manner (0.1- 10 μg/ml), while tPA vehicle did not induce any effect (Fig. 8a and corresponding quantification Fig. 8b). At the highest dose (10 μg/ml), the effect of tPA on the migration of OPCs was equivalent to what observed with the chemokinetic factor FGF2 (Fig. 8a and corresponding quantification Fig. 8b). In accordance to what observed in vivo (Fig. 5e), tPA did not exert this effect by influencing OPC proliferation (Fig. 8c).

Finally, because EGFR activation in oligodendrocytes can increase OPC migration [16] and because tPA was reported earlier to activate EGFR on oligodendrocytes [11], we hypothesized that the observed effects of tPA on OPC migration implied EGFR activation.

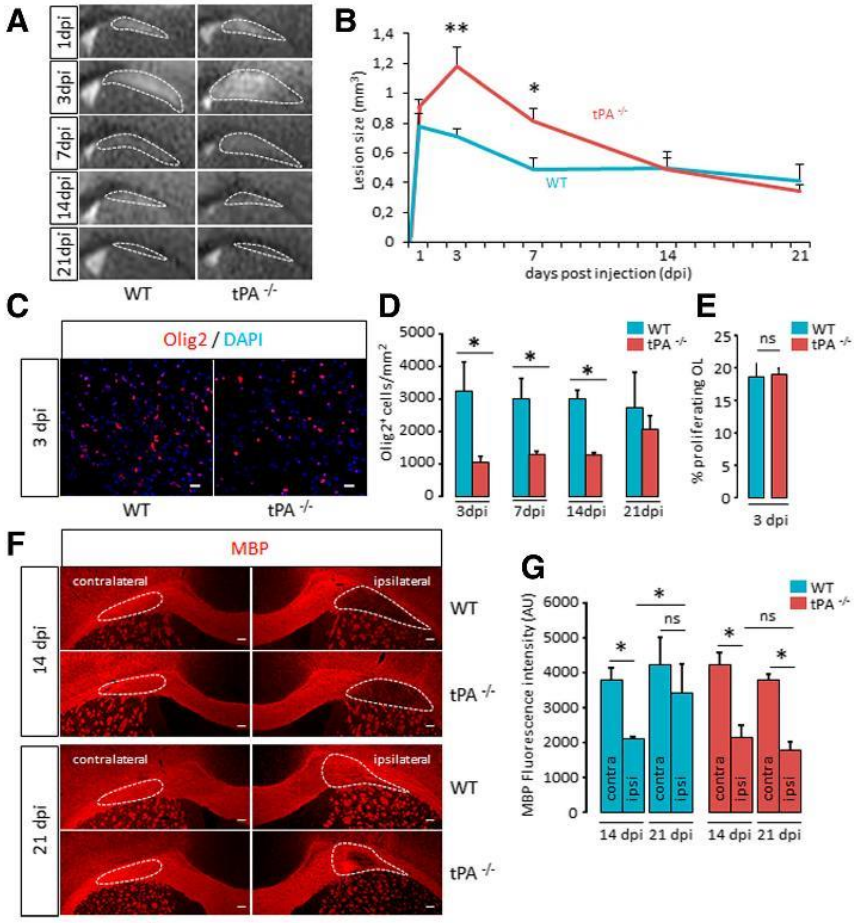


Fig. 5 *Remyelination is delayed in tPA$^{-/-}$ after white matter damage in adult mice.* **a** Representative high resolution T2 images and **b** quantification of the lesion size at 1, 3, 7, 14 and 21 days after lysolecithin injection (dpi) in the corpus callosum of WT and tPA$^{-/-}$ mice. (mean ± SEM, $n = 5$ per group; $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$ significantly, Mann–Whitney *U* test). **c** Photomicrographs from corpus callosum sections (perilesion) show representative images (from 3 mice) of Olig2 immunostaining (red) and DAPI staining (blue) from WT (left) and tPA$^{-/-}$ (*right*) mice at 3 days post injection (dpi). (Scale bars: 20 μm). **d** Corresponding quantifications of Olig2$^+$ oligodendrocytes (mean ± SEM, $n = 3$ per group; $*p < 0.05$). **e** Quantification of the percentage of proliferating OLs (Ki67$^+$Olig2$^+$/Olig2$^+$) in the lesion of WT and tPA$^{-/-}$ mice, 3 days post-injection. (mean ± SEM, $n = 3$ per group). **f** Photomicrographs from brain sections (corpus callosum lesion) show representative images (from 3 mice per group) of MBP immunostaining (*red*) in the ipsilateral and contralateral corpus callosum of WT and tPA$^{-/-}$ mice, 14 and 21 days post-injection (dpi). Dotted lines show quantified area limits. (Scale bars: 100 μm). **g** Corresponding quantifications of MBP fluorescence intensity (mean ± SEM, $n = 3$ per group; $*p < 0.05$). *AU: arbitrary unit; dpi: days post injection; OL: oligodendrocyte; WT: wild type. tPA$^{-/-}$: tPA Knock-out*

First, we investigated whether oligodendrocytes express EGFR, which would confer them potential responsiveness to EGF-like signals mediated by tPA. During spinal cord development, EGFR was detected in the pMN domain (ventral ventricular zone) (Fig. 9a) in Olig2$^+$/Sox2$^+$ OPCs (Fig. 9b, Additional file 3: Figure S2) at early stages of OPC migration (E13), a subset of these cells being also positive for PDGFR-α (Additional file 3: Figure S2). In all cases, OPCs lost EGFR staining at later developmental stages, when they have left the pMN domain (Fig. 9a, Additional file 3: Figure S2). Interestingly, EGFR$^+$ OPCs were found at the vicinity of tPA immunoreactivity within the pMN domain (Fig. 9a), which was compatible with an interaction of tPA with EGFR on OPCs. Concerning remyelination after white matter lesion, EGFR was expressed in the damaged corpus callosum from 3dpi, and this expression gradually disappeared with time until 21dpi (Fig. 9c). Consistent with a role of EGFR in the migration of OPCs, this receptor was detected, in the remyelinating lesion, in Olig2$^+$/Sox2$^+$ cells (Fig. 9d, Additional file 3: Figure S2). Together, these data indicate that EGFR, in the conditions studied here, is expressed in early, Olig2+/Sox2+ oligodendrocyte precursors.

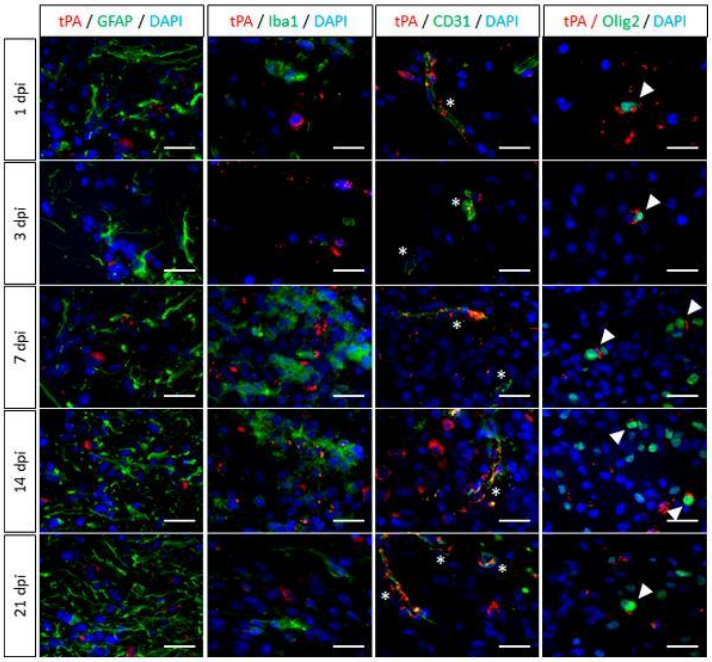


Fig. 6 *tPA expression after white matter damage in wild type mice.* Photomicrographs from tissue sections show representative images of tPA (*red*), GFAP (*green, first column*), Iba1 (*green, second column*), CD31 (*green, third column*), Olig2 (*green, fourth column*) and DAPI staining (*blue*) immunoreactivities in the remyelinating corpus callosum of WT mice, 1, 3, 7, 14 and 21 days after lysolecithin injection. Asterisks show colocalization of tPA and CD31 immunoreactivities in endothelial cells. Filled arrowheads show colocalization of tPA and Olig2 immunoreactivities in oligogendrocytes. (Representative images, $n = 3$ per group). *dpi: days post injection.* Scale bars: 20 μm

Our last step was to address the implication of EGFR in tPA effects in our chemokinesis assay in vitro. We confirmed that cultured OPCs express EGFR (Fig. 9e). As described before (Fig. 8), tPA (10 μg/ml) induced a chemokinetic effect equivalent to the typical chemokine FGF2 (Fig. 9f). Noteworthy, while the EGFR inhibitor AG1478, when added alone, did not induce any effect on OPC migration, it reversed the chemokinetic effect of tPA (Fig. 9f). In contrast, OPC migration was not modified when the enzymatic activity of tPA was blocked by the inhibitory peptide GGACK (Fig. 9f). Finally, tPA treatment in OPC induced an early (from 5 min) and transient phosphorylation of the extracellular-regulated kinases (Erk), a downstream effectors of the EGFR pathway (Fig. 9g), as reported earlier [11]. Together, these data show that tPA can promote chemokinetic effects on OPCs via the protease-independent activation of EGFR.

Discussion

The present study reports the effects of tPA on the migration of OPCs during embryonic development and during remyelination after white matter lesion. We show that, in both situations, OPC migration is delayed in $tPA^{-/-}$ animals. This was illustrated by a lower number of OPCs leaving the pMN zone (spinal cord development) or reaching the remyelinating corpus callosum (post-lesion recovery) in $tPA^{-/-}$ mice. During development and regeneration, we observed that tPA was expressed in vessels. Interestingly, in both cases, OPC migration occurred along vessels and the proportion of OPCs surrounding these vessels was reduced in $tPA^{-/-}$ animals. Finally, we highlighted the role of EGFR signaling in these processes by showing that EGFR was expressed on migrating OPCs and that, in vitro, tPA exerted a chemokinetic effect on OPCs which was mediated by the activation EGFR.

The involvement of tPA in the migration of neurons during development of the CNS has been first shown more than 15 years ago [14] and has been confirmed later [24]. The present study brings new advances by showing that oligodendrocyte migration is also facilitated by tPA. In fact, tPA increases the migration of several other cell types, within or outside the central and peripheral nervous system, such as macrophages [25, 26] or cancer cells [27]. However, in the CNS, while most studies report the influence of tPA on migration during development, the issue of how the pro-migratory effects of tPA can influence pathological situations has been scarcely addressed [28]. Our study brings new elements by

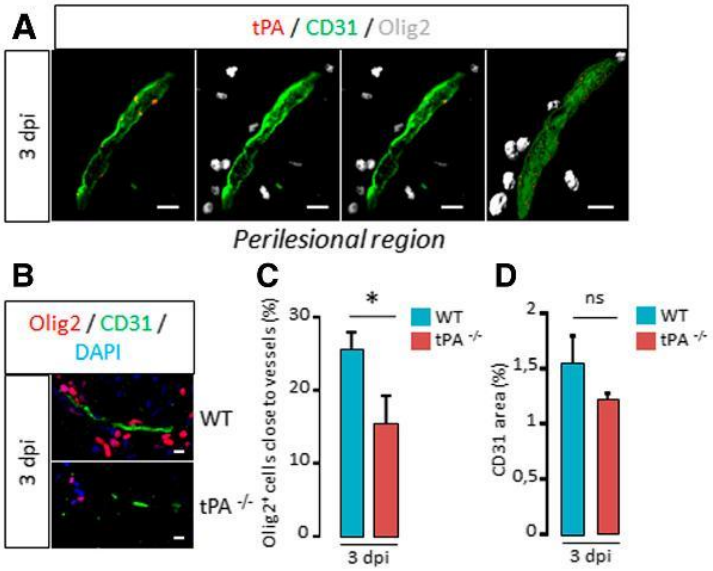


Fig. 7 *tPA promotes oligodendrocyte migration along vessels after white matter damage.* **a** Photomicrographs from brain sections show representative images (from 3 mice) of tPA (*red*), CD31 (*green*) and Olig2 (*grey*) immunostaining in the corpus callosum lesion of WT mice at 3 days post injection (3 dpi). Right image is a rotation of 3D reconstruction from confocal acquisitions (on the *left*). **b** Photomicrographs from tissue sections show representative images (from 3 mice per group) of Olig2 (*red*), CD31 (*green*), and DAPI (*blue*) immunostaining in the corpus callosum (perilesion) of WT and $tPA^{-/-}$ mice spinal cords at 3 days post injection (3 dpi). **c** Quantification of the percentage of $Olig2^+$ oligodendrocytes close (<10 μm) to vessels in the in the corpus callosum (perilesion) in WT and $tPA^{-/-}$ mice (mean ± SEM, $n = 3$ per group; $*p < 0.05$). **d** Quantification of the percentage of $CD31^+$ staining area in corpus callosum (perilesion) in WT and $tPA^{-/-}$ mice (mean ± SEM, $n = 3$ per group; $*p < 0.05$). *E: embryonic day; OL: oligodendrocyte; pMN domain: motor neuron progenitor domain; WT: wild type.* Scale bars: 10 μm

highlighting the potential role of tPA on oligodendrocyte migration during white matter damage. This suggests implication for several pathologies in which white matter is damaged, such as multiple sclerosis, leukodystrophies, periventricular leukomalacia, white matter stroke, head trauma or spinal cord injury.

Interestingly, in our study, we show that tPA invalidation leads to a delay in oligodendrocyte migration during development and after white matter demyelination. This suggests that, despite the fact that the oligodendrocyte populations involved in these two situations are different [29], their chemokinetic response to tPA would be equivalent. Pro-migratory effect of tPA was observed in the corpus callosum and in the spinal cord, which suggests equivalent responses in these two regions of the CNS. Thus, tPA appears to rise homogeneous responses in oligodendrocytes migration regardless of the age (embryo, adult), region (telencephalon, spinal cord) or pathological state.

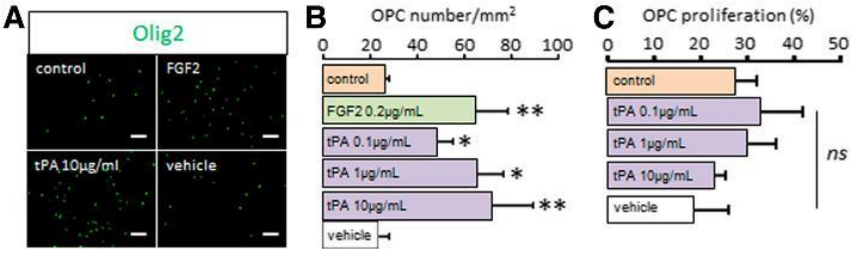


Fig. 8 tPA induces chemokinesis on cultured OLs. **a** Rat primary cultures of OPCs were seeded on the upper compartment of Boyden chambers and treated in indicated conditions for 24 h. Photomicrographs show representative fields of the lower compartment after Olig2 immunostaining (*green*; representative image, $n = 9$, three independent cultures). **b** Oligodendrocyte chemokinesis was estimated by counting cells in the lower compartment in control conditions or in the presence of 0.2 μg/mL FGF2, 0.1-10 μg/mL tPA or tPA vehicle. (mean ± SEM; $n = 9$, three independent cultures; $*p < 0.05$ and $**p < 0.01$). **c** OL proliferation (percentage) during 24 h was estimated by measuring mitochondrial activity with WST-1 test after treatment or not. Control is the basal OL proliferation during 24 h without treatment (mean + SEM; $n = 15$, five independent cultures). *OPC: oligodendrocyte precursor cell; ns: not significant.* Scale bars: 100 μm

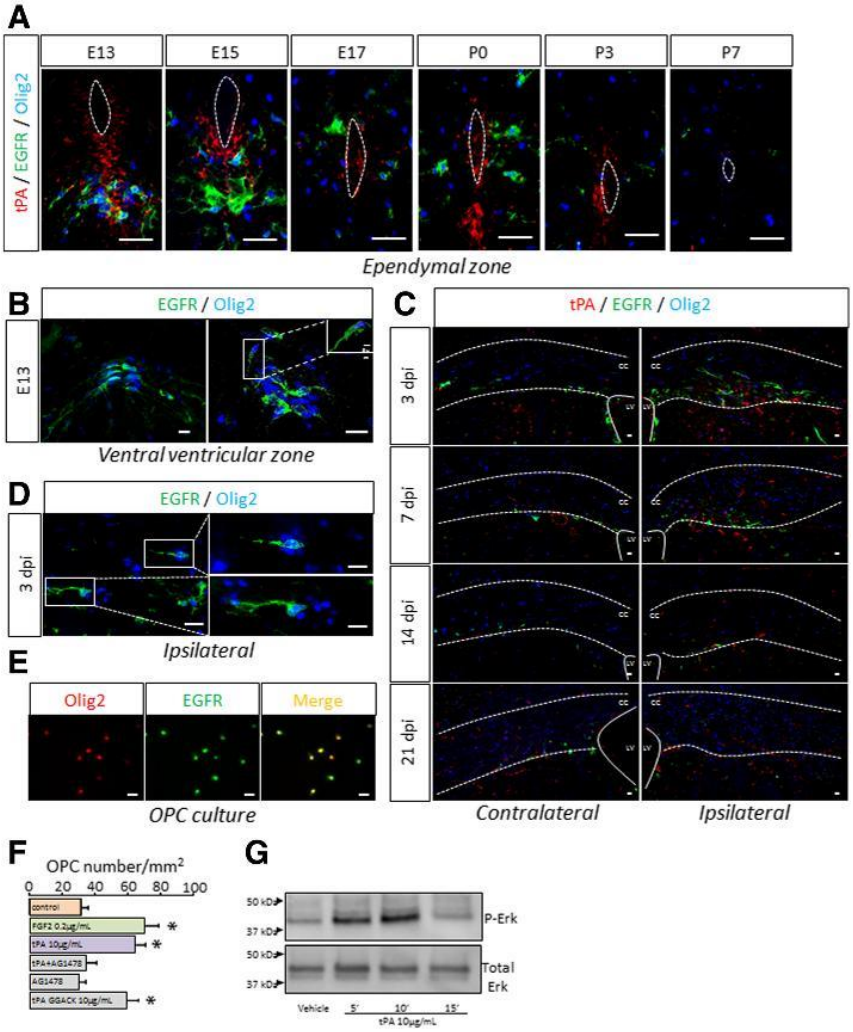


Fig. 9 *tPA induces chemokinesis on OLs via its EGF-like domain*. **a** Photomicrographs from WT mice tissue sections show representative images of tPA (*red*), EGFR (*green*) and Olig2 (*blue*) immunoreactivities in the ventral ventricular zone of mice spinal cords at E13, E15, E17, P0, P3 and P7. Dotted lines show ependymal canal limits. (Representative images, $n = 3$ per group). **b** Photomicrographs from WT mice tissue sections show representative images of EGFR (*green*) and Olig2 (*blue*) immunoreactivities in the pMN domain of mice spinal cords at E13. The inlet shows 3D reconstruction from confocal acquisition. (Representative images, $n = 3$ per group). **c** Photomicrographs from WT mice tissue sections show representative images of tPA (*red*), EGFR (*green*) and Olig2 (*blue*) immunoreactivities in the contralateral (*left column*) and ipsilateral (*right column*) corpus callosum of adult mice, 3, 7, 14 and 21 days after lysolecithin injection. Full lines show lateral ventricle limits and dotted lines show corpus callosum limits. (Representative images, $n = 3$ per group). **d** Photomicrographs from adult WT mice tissue sections show representative images of EGFR (*green*) and Olig2 (*blue*) immunoreactivities in the lesion 3 days after injection. (Representative images, $n = 3$ per group). **e** Rat OPCs were cultured for 24 h. Photomicrographs show representative fields after Olig2 (*red*) and EGFR (*green*) immunostaining or the merged images (*yellow*). (representative images, $n = 3$ per group). **f** Rat primary cultures of OPCs were seeded on the upper compartment of Boyden chambers and treated in indicated conditions for 24 h. **g** Proteins from cultured OPCs treated with tPA (10µg/ml) or corresponding vehicle for indicated times were subjected to western blot for the phosphorylated (P-Erk) or total (Total Erk) forms of Erk. Chemokinesis was estimated by counting cells in the lower compartment in control conditions or in the presence of 0.2 µg/mL FGF2, 10 µg/mL tPA, 10 µg/mL tPA + 5 µM inhibitor of the kinase activity of EGFR (AG1478), 5 µM AG1478, 10 µg/mL tPA complexed with the proteolytic inhibitory peptide GGACK. (mean ± SEM; $n = 9$, three independent cultures; $*p < 0.05$, Mann–Whitney *U* test). *cc: corpus callosum; dpi: days post injection; E: embryonic day; LV: lateral ventricle; OPC: oligodendrocyte precursor cell; P: postnatal day*. Scale bars: 20 µm

Although the mechanism of action of tPA on migration was suggested before to involve proteolytic degradation of the extracellular matrix [24], our data show that tPA can also exert protease independent chemokinetic effects on OPCs by activating the EGFR. Several previous in vitro studies reported protease-independent

effects of tPA on neurons [30–32] and oligodendrocytes precursors [11] via a mechanism termed as cytokine- or growth factor–like. In OPCs, EGF receptor activation by tPA was shown to mediate antiapoptotic effects, thus sustaining protection of the white matter after experimental ischemic stroke [11]. The present study indicates that tPA can also exert pro-migratory effect on OPCs by activating EGFR. Several differences in the experimental approach explain why pro-migratory, rather than anti-apoptotic effects are unveiled in the present work. First, the lesion model used here is based on the detergent properties of lysolecithin which toxic effects largely supplants apoptosis. In effect, the lesion size at 1dpi is mostly similar in wild type and $tPA^{-/-}$ animals, and the effect of tPA invalidation appears only from 3dpi, when OPC migration and remyelination starts. Second, our study addresses the effect of endogenous tPA, while in previous works [11] tPA was injected to the animals. The impact of tPA injection largely differs from that of endogenous tPA in terms of dose, timing and accessibility to injured tissues. Finally, the timing in which the study was conducted is also different: while in the Correa et al. paper, the impact of tPA injection was assessed in the subacute phase (1 day post ischemia), in the present study, histological analysis were performed in subacute and chronic phases (up to 21dpi), which enables observing tissue regeneration, in particular OPC migration.

The activation of EGFR pathway has been previously described as an activator of OPC migration. Migratory $NG2^+$ cells express more EGFR than non-migratory cells [16] and overexpression in non-migratory cells prompts them to migrate [16]. Accordingly, EGFR-expressing retinal progenitor cells show increased chemokinesis in the presence of EGF [33]. In the context of white matter lesion, overexpression or invalidation of EGFR signaling in oligodendrocytes respectively accelerate [34] or reduces [35] remyelination after focal demyelination of corpus callosum. In light of these findings, the effect of intranasal EGF treatment was tested in a mouse model of preterm diffuse white matter injury [36]. This treatment led to enhanced generation of OPCs, leading to functional recovery [36]. Chemokinetic effects were proposed to sustain these effects of EGFR signaling activation, as EGF induces neural precursor cells to differentiate to glial cells and to acquire a motile phenotype [37]. In our study, we suggest that this EGFR-dependent pathway could be activated by tPA to exert pro-migratory effects on OPCs in pathological conditions where white matter is damaged, without inducing hyperplasia of OPCs as reported when EGFR is constitutively expressed [38].

The increase in the number of OPCs during remyelination upon EGFR activation has been suggested in the past to occur via increased proliferation, enhanced differentiation from neural progenitors, migration or combinations of these different mechanisms [39–41]. Here we show that tPA does not influence OPC proliferation in vitro, but rather enhances their migration via a chemokinetic dependent on the activation of EGFR. One possibility to explain this difference is that the activation of EGFR by tPA, by its natural ligand (EGF) or by genetic strategies can induce different response in target cells, in particular because the degree of activation of downstream targets in these different situations may vary considerably.

Our in vitro data suggest that tPA mediates its promigratory effects, at least in part, by activation of EGFR and independently of its proteolytic activity. Nevertheless, proteolytic effects have also been suggested: tPA was shown to proteolytically activate proBDNF into mature BDNF, which increases proliferation of OPCs in vitro [42] andpromotes remyelination when injected intra veinously after WM stroke [43]. In our hands, tPA invalidation did not modify proliferation of OPC, which claims for a different mechanism. Activation of growth factor pathways by tPA can also occur by a regulation of expression, rather than maturation: tPA upregulates vascular endothelial growth factor (VEGF) by endothelial cells [44] which others have reported to promote the migration of oligodendrocyte precursor cells in vitro [45, 46]. Notheworthy, whether the VEGF pathway targets OPC proliferation [47] or not [46] is still a matter of debate. In any case, we report here that tPA deficiency did not influence OPC proliferation. Further studies may help decipher possible links between tPA and the VEGF pathway in OPC migration in vivo, during development and/or remyelination.

The previous point highlights the possible cooperative role between endothelial cells and OPCs during (re)myelination. This has led to the concept of « oligovascular niche » [48]: vascular cells would secrete soluble factors (including VEGF) which promotes migration and survival of oligodendrocytes [49]. Because tPA is mainly produced by endothelial cells, it could be one of these oligotrophic factors. In our hands, the common cellular source of tPA in development and adult remyelination was endothelial cells, which corroborates a possible role of endothelial-derived tPA in the observed effects on OPC migration. This is particularly relevant to the increasing literature describing that migration of progenitor cells, including OPCs, is guided by vessels. Blood vessels form a scaffold for migration of neuroblasts to the adult olfactory bulb [50], and more recently, a similar mechanism has been described specifically for OPCs migration [21]. A cooperation between vessels and progenitors exists, in which neural progenitors (including OPCs) induce local angiogenesis while migrating, which in turns facilitates progenitor emigration from the niche [51]. This « vasophilic » migration [50] was described during development in previous studies, but the present work is to our knowledge the first to describe it during remyelination

after white matter lesion. This is particularly interesting in regard to the description of perivascular tPA deposits in acute MS lesions [52], a type of demyelinated plaque where remyelination may succeed spontaneously.

Pericytes have also been suggested to influence OPC migration [53], which raises the question of the expression of tPA in pericytes. During development, we did not detect pericytes in the developing spinal cord at E13, when the phenotypic differences between wt and $tPA^{-/-}$ first occurred (data not shown), which is likely due to the immaturity of the vessels of the spinal cord at this stage, in which pericytes are usually not reported [54–56]. After white matter lesion, tPA was not detected in pericytes surrounding blood vessels at 3 dpi (Additional file 4: Figure S3), when the delay in OPC migration was observed in $tPA^{-/-}$ as compared to wt mice. This is in accordance with our previous report of the absence of tPA in adult pericytes [12]. Nevertheless, we not cannot exclude with certitude that tPA is not expressed in pericytes, and this should be the purpose of future studies.

This link between angiogenesis and OPC migration is relevant to white matter pathology, in particular multiple sclerosis, in which angiogenesis has been described [57]. tPA could be involved in these processes in regard to a previous study in experimental autoimmune encephalomyelitis, a model of multiple sclerosis, in which recovery is reduced in $tPA^{-/-}$ animals [58]. Noteworthy, while wild type animals showed remyelination in late phases of the disease, this remyelination was severely reduced in $tPA^{-/-}$ animals [58]. The present study brings new elements in a model where demyelination is the primary insult:we here show that the delay in OPC migration to the damaged area results in reduced remyelination in $tPA^{-/-}$ mice. This strengthens the idea that the failure in recovery in $tPA^{-/-}$ in EAE could be the result of a reduced capacity of remyelination. Overall, the present data suggest that endogenous tPA could be important for remyelination in multiple sclerosis. In accordance with this, tPA activity has been shown to be decreased in post-mortem tissues from MS patients [59], alleging that a drop of tPA may participate in reducing the opportunity of remyelination in MS patients.

Conclusion

The present study shows that tPA provides chemokinetic effects on OPCs. This effect leads to facilitating migration of these cells during CNS and remyelination after white matter lesion. Our in vitro results suggest that this effect is mediated by the activation of EGFR, expressed on OPCs, by the virtue of the EGF-like domain contained in tPA structure. These results highlight the potential role of tPA on OPCs in situation of white matter lesion. They suggest that, in combination with previously described anti-apoptotic activity, the chemokinetic effects of tPA could be targeted to improve myelin recovery in pathological conditions.

Additional files

Additional file 1: Table S1. Antibodies used in the study. Each antibody used in this study is listed together with its supplier, species, type (monoclonal/polyclonal), dilution and reference. (DOCX 16 kb)

Additional file 2: Figure S1. *Oligodendrocyte number in the contralateral corpus callosum of $tPA^{-/-}$ and WT mice.* Quantification of OLs ($Olig2^+$) in the contralateral corpus callosum of WT and $tPA^{-/-}$ mice, 3, 7, 14 and 21 days after lysolecithin injection (mean + SEM, $n = 3$ per group). *dpi: days post injection; OL: oligodendrocyte; WT: wild type.* (TIF 523 kb)

Additional file 3: Figure S2. *EGFR is expressed in early oligodendrocyte precursors.* Photomicrographs from embryonic spinal cord (ventral ventricular zone, E13) and perilesional adult corpus callosum (3dpi) WT mice tissue sections show representative confocal images of EGFR (green), Sox2 or PDGFRα (red) and DAPI (blue) immunoreactivities. Asterisks indicate $PDGFR\alpha^+/EGFR^-$ cells and arrowheads indicate $PDGFR\alpha^+/EGFR^+$ cells (Representative images from $n = 3$). Scale bars: 10 μm. (TIF 585 kb)

Additional file 4: Figure S3. *tPA is not detected in PDFGR-β^+ pericytes.* (A) Photomicrographs from adult WT mice tissue sections show representative confocal images of PDGFR-β (green), tPA (red) and DAPI (blue) immunoreactivities in the lesion 3 days after injection. (Representative images from $n = 3$). Inlets show side view reconstructions of the z-stack. (B) Representative fluorescent intensity/distance graph measured from confocal image in (A) showing that tPA (Red) is not found in colocalization with PDGFR-β staining. (TIF 328 kb)

Abbreviations

CNS: Central nervous system; dpi: Days post injection; EGF: Epidermal growth factor; MS: Multiple sclerosis; OPCs: Oligodendrocyte precursor cells; pMN: Motor neuron progenitor; tPA: Tissue-type plasminogen activator; $tPA^{-/-}$: tPA Knock-out; WT: wild type

Acknowledgements

We are grateful to Isabelle Bardou and Sophie Lenoir for their contribution to confocal acquisitions and 3D reconstructions, and to Mikaël Naveau for his help with statistics.

Funding

This work was supported by the French *Insitut National de la Santé et de la Recherche Médicale* (Inserm), the *Fondation pour la recherche médicale* (FRM), the Spanish *Ministerio de Economía y Competitividad*-MINECO (grants SAF2012-40023, RD12-0032-12 and PI15/00963, partially funded by F.E.D.E.R.) and *Association française de recherche sur la sclérose en plaques* (ARSEP foundation). CL and AF were funded by the *Conseil regional de Normandie*. MP was funded by fellowships from the French *Ministère de la recherche et de l'enseignement supérieur* and from FRM.

Availability of data and materials

The datasets of the current study are available from the corresponding author on reasonable request.

Authors' contributions

CL designed the experiments, induced the lesions, performed the histology, carried out the in vitro studies and participated in writing the article. RM designed the study, set up the lysolecithin model and participated in writing the article. MP generated embryonic tissues and performed immunoassays. YH set up and performed the immunoblots. JB set up the lysolecithin model. AF performed MRI studies. MP performed the histological studies in the embryonic brain. IM set up the in vitro migration assay. DV drafted the article. DC gave its technical support in the design and performance of in vitro migration assays and drafted the article. FDC gave its expertise in the design of in vitro migration assays and drafted the article. EM designed the study and wrote the article. FD designed the study and wrote the article. All authors read and approved the final manuscript.

Competing interests

The authors declare that they have no competing interests.

Consent for publication
Not applicable.

Ethics approval
Animal experiments were performed in our laboratory (agreement number D14118001) in accordance with French ethical laws (act no. 87–848; *Ministère de l'Agriculture et de la Forêt*), European Union Council Directives of November 24, 1986 (2010/63/EEC) and guidelines for the care and use of laboratory animals. Experiments have been approved by the ethics committee n°52 on animal experiments (CENOMEXA) and by the French Ministry of Research under the project license number 02653.2 (30/06/2016). None of the experimental procedures induced animal mortality. All experiments were performed following the ARRIVE guidelines (www.nc3rs.org.uk), including randomization of treatment as well as analysis blind to the treatment.

Author details
[1]Normandie Univ, UNICAEN, INSERM U1237, Physiology and imaging of neurological disorders (PhIND), Cyceron, Caen 14000, France. [2]Grupo de Neurobiología del Desarrollo-GNDe, Hospital Nacional de Parapléjicos-SESCAM, Toledo, Spain. [3]Grupo de Neuroinmuno-reparación, Hospital Nacional de Parapléjicos, Toledo, Spain. [4]Grupo de Neurobiología del Desarrollo (GNDe), Instituto Cajal, CSIC, Madrid, Spain. [5]Inserm, Centre Cyceron, Bvd Becquerel, BP5229, Caen Cedex 14074, France.

Received: 21 September 2016 Accepted: 10 February 2017
Published online: 23 February 2017

References

1. Franklin RJM, ffrench-Constant C. Remyelination in the CNS: from biology to therapy. Nat Rev Neurosci. 2008;9:839–55.
2. Goldschmidt T, Antel J, König FB, Brück W, Kuhlmann T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. Neurology. 2009;72:1914–21.
3. Patrikios P, Stadelmann C, Kutzelnigg A, Rauschka H, Schmidbauer M, Laursen H, et al. Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients. Brain. 2006;129:3165–72.
4. Bramow S, Frischer JM, Lassmann H, Koch-Henriksen N, Lucchinetti CF, Sørensen PS, et al. Demyelination versus remyelination in progressive multiple sclerosis. Brain. 2010;133:2983–98.
5. Kremer D, Göttle P, Hartung H-P, Küry P. Pushing forward: remyelination as the New frontier in CNS diseases. Trends Neurosci. 2016;39:246–63.
6. Stankoff B, Jadasz JJ, Hartung H-P, Küry P, Zalc B, Lubetzki C. Repair strategies for multiple sclerosis: challenges, achievements and perspectives. Curr Opin Neurol. 2016;29:286–92.
7. Zawadzka M, Rivers LE, Fancy SPJ, Zhao C, Tripathi R, Jamen F, et al. CNS-resident glial progenitor/stem cells produce Schwann cells as well as oligodendrocytes during repair of CNS demyelination. Cell Stem Cell. 2010;6:578–90.
8. Castro F de, Zalc B. Comprehensive Developmental Neuroscience: Cellular Migration and Formation of Neuronal Connections: Chapter 23. Migration of Myelin-Forming Cells in the CNS. St. Louis: Elsevier Inc. Chapters; 2013.
9. Fancy SPJ, Chan JR, Baranzini SE, Franklin RJM, Rowitch DH. Myelin regeneration: a recapitulation of development? Annu Rev Neurosci. 2011;34:21–43.
10. de Castro F, Bribián A, Ortega MC. Regulation of oligodendrocyte precursor migration during development, in adulthood and in pathology. Cell Mol Life Sci. 2013;70:4355–68.
11. Correa F, Gauberti M, Parcq J, Macrez R, Hommet Y, Obiang P, et al. Tissue plasminogen activator prevents white matter damage following stroke. The Journal of Experimental Medicine. Rockefeller University Press. 2011;208:1229–42.
12. Louessard M, Lacroix A, Martineau M, Mondielli G, Montagne A, Lesept F, et al. Tissue plasminogen activator expression is restricted to subsets of excitatory pyramidal glutamatergic neurons. Mol Neurobiol. 2015.
13. Docagne F, Parcq J, Lijnen R, Ali C, Vivien D. Understanding the functions of endogenous and exogenous tissue-type plasminogen activator during stroke. Stroke J Cerebral Circulation. 2015;46:314–20.
14. Seeds NW, Basham ME, Haffke SP. Neuronal migration is retarded in mice lacking the tissue plasminogen activator gene. Proc Natl Acad Sci U S A. 1999;96:14118–23.
15. Henry VJ, Lecointre M, Laudenbach V, Ali C, Macrez R, Jullienne A, et al. High t-PA release by neonate brain microvascular endothelial cells under glutamate exposure affects neuronal fate. Neurobiol Dis. 2013;50:201–8.
16. Aguirre A, Rizvi TA, Ratner N, Gallo V. Overexpression of the epidermal growth factor receptor confers migratory properties to nonmigratory postnatal neural progenitors. J Neurosci Soc Neurosci. 2005;25:11092–106.
17. Carmeliet P, Schoonjans L, Kieckens L, Ream B, Degen J, Bronson R, et al. Physiological consequences of loss of plasminogen activator gene function in mice. Nature. 1994;368:419–24.
18. McCarthy KD, de Vellis J. Preparation of separate astroglial and oligodendroglial cell cultures from rat cerebral tissue. The Journal of Cell Biology. Rockefeller University Press. 1980;85:890–902.
19. Murcia-Belmonte V, Esteban PF, García-González D, De Castro F. Biochemical dissection of Anosmin-1 interaction with FGFR1 and components of the extracellular matrix. J Neurochem Blackwell Publishing Ltd. 2010;115:1256–65.
20. Rowitch DH. Glial specification in the vertebrate neural tube. Nature Rev Neurosci Nature Publishing Group. 2004;5:409–19.
21. Tsai H-H, Niu J, Munji R, Davalos D, Chang J, Zhang H, et al. Oligodendrocyte precursors migrate along vasculature in the developing nervous system. Science. 2016;351:379–84.
22. Richardson WD, Kessaris N, Pringle N. Oligodendrocyte wars. Nat Rev Neurosci. 2006;7:11–8.
23. Nait-Oumesmar B, Decker L, Lachapelle F, Avellana-Adalid V, Bachelin C. Van Evercooren AB-. Progenitor cells of the adult mouse subventricular zone proliferate, migrate and differentiate into oligodendrocytes after demyelination. European Journal of Neuroscience. Blackwell Science Ltd. 1999;11:4357–66.
24. Raoult E, Bénard M, Komuro H, Lebon A, Vivien D, Fournier A, et al. Cortical-layer-specific effects of PACAP and tPA on interneuron migration during post-natal development of the cerebellum. J Neurochem. 2014;130:241–54.
25. Ling C, Zou T, Hsiao Y, Tao X, Chen Z-L, Strickland S, et al. Disruption of tissue plasminogen activator gene reduces macrophage migration. Biochem Biophys Res Commun. 2006;349:906–12.
26. Cao C, Lawrence DA, Li Y, Von Arnim CAF, Herz J, Su EJ, et al. Endocytic receptor LRP together with tPA and PAI-1 coordinates Mac-1-dependent macrophage migration. EMBO J. 2006;25:1860–70.
27. Dung TD, Feng C-C, Kuo W-W, Pai P, Chung L-C, Chang S-H, et al. Suppression of plasminogen activators and the MMP-2/-9 pathway by a Zanthoxylum avicennae extract to inhibit the HA22T human hepatocellular carcinoma cell migration and invasion effects in vitro and in vivo via phosphatase 2A activation. Biosci Biotechnol Biochem. 2013;77:1814–21.
28. Achuta VS, Rezov V, Uutela M, Louhivuori V, Louhivuori L, Castrén ML. Tissue plasminogen activator contributes to alterations of neuronal migration and activity-dependent responses in fragile X mice. J Neurosci. 2014;34:1916–23.
29. Moyon S, Dubessy AL, Aigrot MS, Trotter M, Huang JK, Dauphinot L, et al. Demyelination causes adult CNS progenitors to revert to an immature state and express immune cues that support their migration. J Neurosci. 2015;35:4–20.
30. Liot G, Roussel BD, Lebeurrier N, Benchenane K, López-Atalaya JP, Vivien D, et al. Tissue-type plasminogen activator rescues neurones from serum deprivation-induced apoptosis through a mechanism independent of its proteolytic activity. J Neurochem. 2006;98:1458–64.
31. Lee H-Y, Hwang I-Y, Im H, Koh J-Y, Kim Y-H. Non-proteolytic neurotrophic effects of tissue plasminogen activator on cultured mouse cerebrocortical neurons. J Neurochem. 2007;101:1236–47.
32. Flavin MP, Zhao G. Tissue plasminogen activator protects hippocampal neurons from oxygen-glucose deprivation injury. J Neurosci Res. 2001;63:388–94.
33. Unachukwu UJ, Sauane M, Vazquez M, Redenti S. Microfluidic generated EGF-gradients induce chemokinesis of transplantable retinal progenitor cells via the JAK/STAT and PI3kinase signaling pathways. PLoS One. 2013;8:e83906.
34. Aguirre A, Dupree JL, Mangin JM, Gallo V. A functional role for EGFR signaling in myelination and remyelination. Nature Neurosci Nature Publishing Group. 2007;10:990–1002.
35. Aguirre A, Gallo V. Reduced EGFR signaling in progenitor cells of the adult subventricular zone attenuates oligodendrogenesis after demyelination. Neuron glia biology. NIH Public Access. 2007;3:209–20.
36. Scafidi J, Hammond TR, Scafidi S, Ritter J, Jablonska B, Roncal M, et al. Intranasal epidermal growth factor treatment rescues neonatal brain injury. Nature Publishing Group. 2014;506:230–4.

37. Cohen ME, Fainstein N, Lavon I, Ben-Hur T. Signaling through three chemokine receptors triggers the migration of transplanted neural precursor cells in a model of multiple sclerosis. Stem Cell Res. 2014;13:227–39.
38. Ivkovic S, Canoll P, Goldman JE. Constitutive EGFR signaling in oligodendrocyte progenitors leads to diffuse hyperplasia in postnatal white matter. J Neurosci. 2008;28:914–22.
39. Gonzalez-Perez O, Romero-Rodriguez R, Soriano-Navarro M, Garcia-Verdugo JM, Alvarez-Buylla A. Epidermal growth factor induces the progeny of subventricular zone type B cells to migrate and differentiate into oligodendrocytes. Stem cells (Dayton, Ohio). NIH Public Access. 2009;27:2032–43.
40. Gonzalez-Perez O, Alvarez-Buylla A. Oligodendrogenesis in the subventricular zone and the role of epidermal growth factor. Brain research reviews. NIH Public Access. 2011;67:147–56.
41. Galvez-Contreras AY, Quiñones-Hinojosa A, Gonzalez-Perez O. The role of EGFR and ErbB family related proteins in the oligodendrocyte specification in germinal niches of the adult mammalian brain. Frontiers in Cellular Neuroscience. Frontiers; 2013;7:258.
42. Van't Veer A, Du Y, Fischer TZ, Boetig DR, Wood MR, Dreyfus CF. Brain-derived neurotrophic factor effects on oligodendrocyte progenitors of the basal forebrain are mediated through trkB and the MAP kinase pathway. J Neurosci Res. 2009;87:69–78.
43. Ramos-Cejudo J, Gutiérrez-Fernández M, Otero-Ortega L, Rodríguez-Frutos B, Fuentes B, Vallejo-Cremades MT, et al. Brain-derived neurotrophic factor administration mediated oligodendrocyte differentiation and myelin formation in subcortical ischemic stroke. Stroke. 2015;46:221–8.
44. Suzuki Y, Nagai N, Yamakawa K, Muranaka Y, Hokamura K, Umemura K. Recombinant tissue-type plasminogen activator transiently enhances blood–brain barrier permeability during cerebral ischemia through vascular endothelial growth factor-mediated endothelial endocytosis in mice. Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism. Sage Publications. 2015;35:2021–31.
45. Hayakawa K, Pham L-DD, Som AT, Lee BJ, Guo S, Lo EH, et al. Vascular endothelial growth factor regulates the migration of oligodendrocyte precursor cells. J Neurosci. 2011;31:10666–70.
46. Hayakawa K, Seo JH, Pham L-DD, Miyamoto N, Som AT, Guo S, et al. Cerebral endothelial derived vascular endothelial growth factor promotes the migration but not the proliferation of oligodendrocyte precursor cells in vitro. Neurosci Lett. 2012;513:42–6.
47. Le Bras B, Barallobre M-J, Homman-Ludiye J, Ny A, Wyns S, Tammela T, et al. VEGF-C is a trophic factor for neural progenitors in the vertebrate embryonic brain. Nat Neurosci. 2006;9:340–8.
48. Arai K, Lo EH. An oligovascular niche: cerebral endothelial cells promote the survival and proliferation of oligodendrocyte precursor cells. J Neurosci. 2009;29:4351–5.
49. Arai K, Lo EH. Oligovascular signaling in white matter stroke. Biol Pharm Bull. 2009;32:1639–44.
50. Bovetti S, Hsieh Y-C, Bovolin P, Perroteau I, Kazunori T, Puche AC. Blood vessels form a scaffold for neuroblast migration in the adult olfactory bulb. The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience. Soc Neurosci. 2007;27:5976–80.
51. Cayre M, Courtès S, Martineau F, Giordano M, Arnaud K, Zamaron A, et al. Netrin 1 contributes to vascular remodeling in the subventricular zone and promotes progenitor emigration after demyelination. Development (Cambridge, England). Comp of Biologists Limited. 2013;140:3107–17.
52. Cuzner ML, Gveric D, Strand C, Loughlin AJ, Paemen L, Opdenakker G, et al. The expression of tissue-type plasminogen activator, matrix metalloproteases and endogenous inhibitors in the central nervous system in multiple sclerosis: comparison of stages in lesion evolution. J Neuropathol Exp Neurol. 1996;55:1194–204.
53. Maki T, Maeda M, Uemura M, Lo EK, Terasaki Y, Liang AC, et al. Potential interactions between pericytes and oligodendrocyte precursor cells in perivascular regions of cerebral white matter. Neurosci Lett. 2015;597:164–9.
54. Lindahl P, Johansson BR, Levéen P, Betsholtz C. Pericyte loss and microaneurysm formation in PDGF-B-deficient mice. Science. 1997;277:242–5.
55. Hellström M, Kalén M, Lindahl P, Abramsson A, Betsholtz C. Role of PDGF-B and PDGFR-beta in recruitment of vascular smooth muscle cells and pericytes during embryonic blood vessel formation in the mouse. Development. 1999;126:3047–55.
56. Nakajima M, Yuasa S, Ueno M, Takakura N, Koseki H, Shirasawa T. Abnormal blood vessel development in mice lacking presenilin-1. Mech Dev. 2003;120:657–67.
57. Girolamo F, Coppola C, Ribatti D, Trojano M. Angiogenesis in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. Acta neuropathologica communications. BioMed Central Ltd. 2014;2:84.
58. Lu W, Bhasin M, Tsirka SE. Involvement of tissue plasminogen activator in onset and effector phases of experimental allergic encephalomyelitis. The journal of neuroscience : the official journal of the society for neuroscience. Soc Neurosci. 2002;22:10781–9.
59. Gveric D, Herrera B, Petzold A, Lawrence DA, Cuzner ML. Impaired fibrinolysis in multiple sclerosis: a role for tissue plasminogen activator inhibitors. J Neurology. 2003;126:1590–8.

Submit your next manuscript to BioMed Central and we will help you at every step:

- We accept pre-submission inquiries
- Our selector tool helps you to find the most relevant journal
- We provide round the clock customer support
- Convenient online submission
- Thorough peer review
- Inclusion in PubMed and all major indexing services
- Maximum visibility for your research

Submit your manuscript at
www.biomedcentral.com/submit

BioMed Central

Received: 21 November 2016 | Accepted: 21 February 2017
DOI: 10.1111/nmo.13069

ORIGINAL ARTICLE

WILEY NGM

L. fermentum CECT 5716 prevents stress-induced intestinal barrier dysfunction in newborn rats

T. Vanhaecke[1,2,3,6] | P. Aubert[1,2,3] | P.-A. Grohard[1,2,3] | T. Durand[1,2,3] | P. Hulin[2,4] | P. Paul-Gilloteaux[2,4] | A. Fournier[5] | F. Docagne[5] | A. Ligneul[6] | C. Fressange-Mazda[7] | P. Naveilhan[1,2,3] | H. Boudin[1,2,3] | P. Le Ruyet[6] | M. Neunlist[1,2,3]

[1]INSERM U1235, Nantes, France
[2]Université de Nantes, Nantes, France
[3]Institut des Maladies de l'Appareil Digestif, Nantes, France
[4]MicroPICell - Cellular and Tissular Imaging Core Facility of Nantes, SFR Santé F. Bonamy-FED 4203/Inserm UMS016/CNRS UMS3556, Nantes, France
[5]Normandie Univ, UNICAEN, INSERM, Physiopathology and Imaging of Neurological Disorders (PhIND), Centre Cyceron, Caen, France
[6]Lactalis Recherche et Développement, Retiers, France
[7]Lactalis Nutrition Europe, Torcé, France

Correspondence
Michel Neunlist, Inserm U1235; Faculté de Médecine, Nantes, France.
Email: michel.neunlist@univ-nantes.fr

Funding information
This work was supported by a grant from the Association Nationale de la Recherche et de la Technologie (ANRT) and Lactalis Nutrition Europe (Torcé, France) (n°2013/1189)

Abstract

Background: Intestinal epithelial barrier (IEB) dysfunction plays a critical role in various intestinal disorders affecting infants and children, including the development of food allergies and colitis. Recent studies highlighted the role of probiotics in regulating IEB functions and behavior in adults, but their effects in the newborn remain largely unknown. We therefore characterized in rat pups, the impact of *Lactobacillus fermentum CECT 5716* (L. fermentum) on stress-induced IEB dysfunction, systemic immune response and exploratory behavior.

Methods: Newborn rats received daily by gavage either *L. fermentum* or water. Intestinal permeability to fluorescein sulfonic acid (FSA) and horseradish peroxidase (HRP) was measured following maternal separation (MS) and water avoidance stress (WAS). Immunohistochemical, transcriptomic, and Western blot analysis of zonula occludens-1 (ZO-1) distribution and expression were performed. Anxiety-like and exploratory behavior was assessed using the elevated plus maze test. Cytokine secretion of activated splenocytes was also evaluated.

Key Results: *L. fermentum* prevented MS and WAS-induced IEB dysfunction *in vivo*. *L. fermentum* reduced permeability to both FSA and HRP in the small intestine but not in the colon. *L. fermentum* increased expression of ZO-1 and prevented WAS-induced ZO-1 disorganization in ileal epithelial cells. *L. fermentum* also significantly reduced stress-induced increase in plasma corticosteronemia. In activated splenocytes, *L. fermentum* enhanced IFNγ secretion while it prevented IL-4 secretion. Finally, *L. fermentum* increased exploratory behavior.

Conclusions & Inferences: These results suggest that *L. fermentum* could provide a novel tool for the prevention and/or treatment of gastrointestinal disorders associated with altered IEB functions in the newborn.

KEYWORDS
corticosterone, intestinal epithelial permeability, newborn, probiotic, ZO-1

Abbreviations: CMC, carboxymethylcellulose; EPM, Elevated plus maze; FSA, Fluorescein–5.6 sulfonic acid; GI, Gastrointestinal; HPS, hemalun-phloxine-saffron; HRP, Horse radish peroxidase; IEB, Intestinal epithelial barrierMS, Maternal separation; NEC, Necrotizing enterocolitis; TJ, Tight junctions; WAS, Water avoidance stress

Philippe Aubert and Pierre-Antoine Grohard contributed equally to the work.

1 | INTRODUCTION

The postnatal period is a critical developmental window of the gastrointestinal (GI) tract.[1,2] Various GI functions, such as intestinal epithelial

 © 2017 John Wiley & Sons Ltd

barrier (IEB) functions or motility undergo profound changes during this period.[2–5] Intestinal permeability decreases over the first 30 days of life in humans [6,7] and is also higher in preterm infants as compared to term neonates.[8] Similar to humans, mice or rats demonstrate age-related decrease in intestinal permeability.[9,10] These changes are associated with modifications in intestinal epithelial cells of the expression of various tight junction (TJ) proteins. For instance, in mice, increase in claudin-3, -4, -7, and -15, associated with a continuous reduction in claudin-2, occurs during the first 3 weeks of life.[10,11]

Dysfunction of the IEB, characterized in part by increased permeability, is reported in a wide range of pediatric diseases. For instance, increased permeability and altered TJ expression and distribution occur in necrotizing enterocolitis (NEC) [12,13] and are associated with mucosal lesions [14,15] and behavioral comorbidity.[16] Impaired IEB functions are also reported in food allergies.[17,18] In addition, early life adversity associated with increased IEB dysfunction may contribute in part to the development of diseases such as irritable bowel syndrome or inflammatory bowel diseases in adulthood.[19,20] Therefore, approaches aiming at reducing IEB dysfunction during the neonatal period could be of major therapeutic interest for diseases of the newborn and could help reduce the risk of development of chronic diseases in adults.[21–23]

The gut microbiota plays a major role in the maturation of intestinal immune, motor, and epithelial functions.[24] Concerning the IEB, surprisingly no major change in paracellular permeability [25,26] but reduced transcellular permeability [27] occur in germ-free mice. However, administration of specific probiotic strains in newborns reduces paracellular permeability.[10,28] Interestingly, probiotic mediated effects on IEB functions led to enhanced resistance of the IEB to colitis.[14,29] However, whether, during the neonatal period, probiotics prevent changes in IEB functions induced by acute psychological stress such as water avoidance stress (WAS) or maternal separation (MS) remains currently largely unexplored.

Among probiotics of interest, *Lactobacillus fermentum CECT 5716* (*L. fermentum*), a strain isolated from human milk,[30] could be a putative candidate for reinforcing IEB functions. *L. fermentum* was shown to reduce the incidence of GI infections in infants [31,32] and to protect against GI infections caused by *Salmonella choleraesuis* in mice.[33] *L. fermentum* also exhibited a high rate of adhesion to intestinal epithelial cells *in vitro*.[30] Furthermore, *L. fermentum* possesses an immunoregulatory activity [34] and increases immunological responses in healthy adults.[35] However, it remains unknown whether IEB dysfunction induced by psychological stress in infants could be prevented by *L. fermentum*.

Therefore, we characterized, in a rat pup model, the impact of oral administration of *L. fermentum* on the IEB functions, identified molecular targets responsible for these effects and investigated whether *L. fermentum* modulated exploratory behavior.

Key Points

- Probiotics are known to reduce stress-induced intestinal barrier dysfunction in adulthood but their effects in newborns remain largely unknown.
- In rat pups, *Lactobacillus fermentum CECT5716* (*L. fermentum*) prevented stress-induced changes in intestinal permeability *in vivo* and reduced small intestinal but not colonic permeability. *L. fermentum* reduced stress-induced changes in tight junction organization. *L. fermentum* enhanced exploratory behavior and increased IFNγ production in splenocytes.
- *L. fermentum* could provide a novel tool for prevention and/or treatment of gastrointestinal disorders associated with altered intestinal barrier functions in newborns.

2 | MATERIAL AND METHODS

2.1 | Ethical approval

All procedures were carried out in accordance with the recommendations of the French Veterinary Regulations and Ethics Committee standards and approval of the local Animal Care and Use Committee of Nantes (02376.01) and the European guidelines (directive 2010/63/UE).

2.2 | Animals

Primiparous timed-pregnant Sprague-Dawley rats (Janvier Labs, Le Genest Saint Isle, France) were obtained on gestational day 15. Rats were accustomed to laboratory conditions for 5 days before delivery and individually housed in cages on a 12:12-hours light/dark cycle with free access to food (UAR, Epinay-sur-Orge, France) and water. The day of birth was considered to be PND 1. At birth, rat pups were pooled and randomly assigned to a litter (9-12 per litter).

2.3 | Bacterial strain and preparation

Lactobacillus fermentum strain *CECT 5716* (LF) used in infant formula was provided by Lactalis (Craon, France). The freeze-dried strain was re-hydrated every day in 37°C tap water and administered orally. The dose administered, i.e. 10^9 CFU 100 g body weight^{-1} day^{-1}, was based on results obtained in preliminary experiments in which we showed that 10^9 but not 10^8 CFU 100 g body weight^{-1} day^{-1} significantly reduced *in vivo* paracellular permeability. The volume of gavage was adapted to the weight of the pups, ranging from 100 μL to approximately 400 μL.

2.4 | Study design

In a first series of experiments, newborn rats received by gavage once a day, from postnatal day (PND) 6 to PND 21, either *L. fermentum* (10^9 CFU 100 g body weight^{-1} day^{-1}) or water. PND 6 was chosen to start gavage to minimize risk of lesions and false route due to introduction of cannula. At PND 20, some pups were subjected to a single 2 hour-WAS procedure. At PND 20, paracellular intestinal permeability, plasma corticosterone levels and gut motility were measured

in vivo. A group of pups was also subjected to a behavioral test (Elevated Plus Maze; EPM). At PND 21, a group of pups was subjected to a 2 hour-water avoidance stress (WAS) and permeability was further measured *ex vivo* in jejunum, ileum, and proximal colon in Ussing chambers. Rat pups were anesthetized with isoflurane (1-chloro-2, 2, 2-trifluorethyl difluoromethyl ether; Baxter Medical, Kista, Norway) in a sealed anesthetic chamber prior to cervical dislocation. Intestinal tissue was collected and processed for RT-qPCR, WB and for immunohistochemistry. Spleens were collected for splenocytes extraction.

In a second series of experiments, newborn rats received by gavage once a day, from PND 6 to PND 9, either *L. fermentum* (10^9 CFU 100 g body weight^{-1} day^{-1}) or water. At PND 10, some pups were subjected to a single 4-hour maternal separation (MS). Total intestinal permeability and plasma corticosterone levels were measured.

2.5 | Animal models of stress

2.5.1 | Maternal separation

After delivery, pups were randomly assigned to four experimental groups: water-treated and maternal separated (LF^-MS^+), water-treated and non-separated (LF^-MS^-), *L. fermentum*-treated and maternal separated (LF^+MS^+) or *L. fermentum*-treated and non-separated (LF^+MS^-). A single 4-hour MS (9 am-12 am) was performed once at PND 10, during which pups were removed from their dams, and placed into individual compartments in plastic cages whereas non-separated pups were handled identically, but remained in their home cage with their dam.

2.5.2 | Water avoidance stress

A single 2 hour-WAS (9 am-11 am) was performed at PND 20 or PND 21, during which pups were placed for 2 hours on a platform (3*3 cm^2) positioned at the center of a plastic container (42*42*19 cm^3) filled with water at room temperature up to 1 cm of the top of the platform. Pups were randomly assigned to four experimental groups: water treated and WAS (LF^-WAS^+), water treated and non-WAS (LF^-WAS^-), *L. fermentum* and WAS (LF^+WAS^+) or *L. fermentum* and non-WAS (LF^+WAS^-). Non-WAS pups were handled identically, but remained in their home cage with their dam.

2.6 | *In vivo* evaluation of intestinal permeability and gastrointestinal motility

Paracellular permeability was assessed using the protocol described in (Data S1). Total transit time was assessed as described in (Data S2).

2.7 | *Ex vivo* assessment of intestinal permeability in Ussing chambers

Ex vivo paracellular and transcellular permeability were assessed in the jejunum, ileum, and proximal colon using the protocol described in (Data S3).

2.8 | Isolation of splenocytes, stimulation, and assessment of IL-4 and IFNγ levels in supernatant

Isolation of splenocytes was performed using a protocol described in (Data S4). Cells were co-stimulated with purified NA/LE Mouse Anti-Rat CD3 Clone G4.18 (554829, BD Life Sciences, Le Pont de Claix, France) and purified NA/LE Mouse Anti-Rat CD28 Clone JJ316 (554992, BD Life Sciences) for 48 hours. Supernatants were collected and pooled per condition per individual. IFNγ and IL-4 levels in supernatant were determined by enzyme immunoassay (555198 and 558861 OptEIA Set, BD Life Sciences).

2.9 | Elevated plus maze

The EPM was used to test anxiety-like behavior, ethological parameters, and locomotor activity. The EPM apparatus consisted of two open and two closed arms (each 35 cm long and 5 cm wide) with the closed arms surrounded by 16 cm high walls, and a center area (5 × 5 cm). The maze was raised at 50 cm of the ground. Rat pups were placed in the center area facing a predetermined open arm.

The total recording time was 5 minutes during which the following behaviors were recorded: distance travelled in the whole maze per minute (in cm), to assess general locomotor activity; open and closed arm entries (number) defined as four paws into an arm, to assess anxiety-like behaviors; and rears (number) defined as rat reared on its hind-paws in the central platform or in the closed arms, to assess exploratory activity. Activity was videotaped using a camera mounted above the maze and scored using the open-source Kinovea 0.8.15 software. In order to validate the EPM setup, we first verified that the percentage of entries in open arms obtained with the control group were consistent with the results previously reported with young rats in the same age range as in the present study. We found that the percentage of entries in open arms was 33.8±7.2% % for PND 21 rats, which is similar to the values previously reported (range between 30% and 38%) for PND 21 to PND 30 rats.[36–38]

2.10 | Morphological analysis

Morphological parameters including height of the villi, crypts, submucosa, and of the muscle layers were evaluated in segments of ileum using a protocol described in (Data S5).

2.11 | Immunofluorescence

Preparation of samples and parameters of acquisition are detailed in (Data S6). We developed macros in the open source Fiji analysis software (Fiji Is Just ImageJ) [39] to quantitatively assess the length and intensity of ZO-1 pericellular network. Tight junctions between two adjacent cells are known as bicellular tight junctions, while tricellular tight junctions are observed at the site in which three epithelial cells meet. The length of the cytoplasmic plaque-associated ZO-1 stained

	LF⁻	LF⁺	
	Mean±SEM	Mean±SEM	*P*-value
BMI (g cm^{-2})	0.281±0.00	0.276±0.00	>.05
Weight (g)	50.27±0.71	53.19*±0.62	<.05
Body length (cm)	13.41±0.11	13.81**±0.09	<.01
Length of small intestine (cm)	69.58±1.26	76.98***±1.37	<.001
Length of large intestine length (cm)	10.9±0.37	11.66***±0.28	<.001
Length of small+large intestine (cm)	80.48±1.29	88.63****±1.50	<.0001
Length of small+large intestine length (% body length)	592.14±8.57	633.17**±9.95	<.01
Height of villi (μm)	279.40±17.46	268.9±8.07	>.05
Depth of crypts (μm)	82.52±6.81	77.00±3.74	>.05
Thickness of submucosa (μm)	8.82±0.35	9.34±0.60	>.05
Thickness of serosa+muscular layers (μm)	44.4±3.11	36.5±1.89	>.05

TABLE 1 Morpho-anatomical parameters of postnatal day-21 rat pups supplemented with *Lactobacillus fermentum* (LF⁺) or water (LF⁻). *L. fermentum* increased body length and weight and did not impact body mass index (BMI) as compared to LF⁻ pups (n=42). *L. fermentum* increased the length of the gastrointestinal tract as compared to LF⁻ pups (n=30). Administration of *L. fermentum* did not modify histological parameters of ileum as compared to LF⁻ pups (n=6). Data are expressed as Mean±SEM, significance of differences was determined using Mann–Whitney test. *, **, *** and **** significance is described in column 4.

network was measured as an index of the continuity of the pericellular staining. Intensity of ZO-1 staining was evaluated as an index of ZO-1 content at the bicellular TJ and tricellular TJ respectively. The measurements of the length of stained network and intensity of stained segments (bicellular tight junctions) and intersections (tricellular tight junctions) were made by tubeness processing [40] and analyzed with Skeletonize plugins [41,42] on the projection of 20 image planes of a stack.

2.12 | Quantification of mRNA by RT- qPCR

Gene expression of the tight junction-associated protein ZO-1 in the terminal ileum was determined by RT-qPCR as previously described [43] and detailed in (Data S7).

2.13 | Plasma corticosterone concentration

Corticosterone concentration in plasma was determined by enzyme immunoassay (Immunodiagnostic System, Paris, France) according to the manufacturer's instructions.

2.14 | Western blot

Ileal expression of ZO-1 was assessed by WB as previously described [44] and further described in (Data S8).

2.15 | Statistical analysis

Values are expressed as means±standard error of the mean (SEM). The significance of differences was determined using either the Mann–Whitney *U* test or the two-way ANOVA followed by a Bonferonni *post hoc* test using GraphPad Prism 5.00 (GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA). Differences were considered statistically significant when $P<.05$.

3 | RESULTS

3.1 | *L. fermentum* promotes body and gastrointestinal growth

At PND 21, the length and weight of LF⁺ rat pups were significantly increased as compared to LF⁻ pups (+3.02%, $P<.01$ and 5.81%, $P<.05$, respectively, n=42). However, body mass index was similar between the two groups (Table 1). At PND 21, the total length of the small and large intestine was significantly greater in LF⁺ pups as compared to LF⁻ pups (+10.13%, $P<.0001$, n=30) even when normalized to animal length (+6.93%, $P=.02$, n=30) (Table 1). Both segments length was increased in LF⁺ as compared to LF⁻ pups (Table 1).

In view of the effect of *L. fermentum* upon intestinal length, we investigated its impact upon morphological parameters in the distal ileum. Parameters such as the height of the villi, crypts, submucosa, and muscle layers were similar between LF⁺ pups and LF⁻ pups (*n*=6) (Table 1).

3.2 | *L. fermentum* modulates intestinal permeability *in vivo* in basal conditions

At PND 20, *L. fermentum* administration reduced by 20% *in vivo* intestinal permeability to FSA ($P<.01$, n=25), but did not modify total transit time, as compared to LF⁻ pups (Figures 1A and B). However, no significant change in permeability to FSA or HRP was observed *ex vivo* in the jejunum, ileum or proximal colon between the two groups (Figures 1C and D).

3.3 | *L. fermentum* reduces MS-induced changes in intestinal permeability and corticosteronemia

We next aimed to determine whether *L. fermentum* modulated changes in intestinal permeability induced by MS. In 10-PND LF⁻ pups subjected to MS, intestinal permeability to FSA was significantly

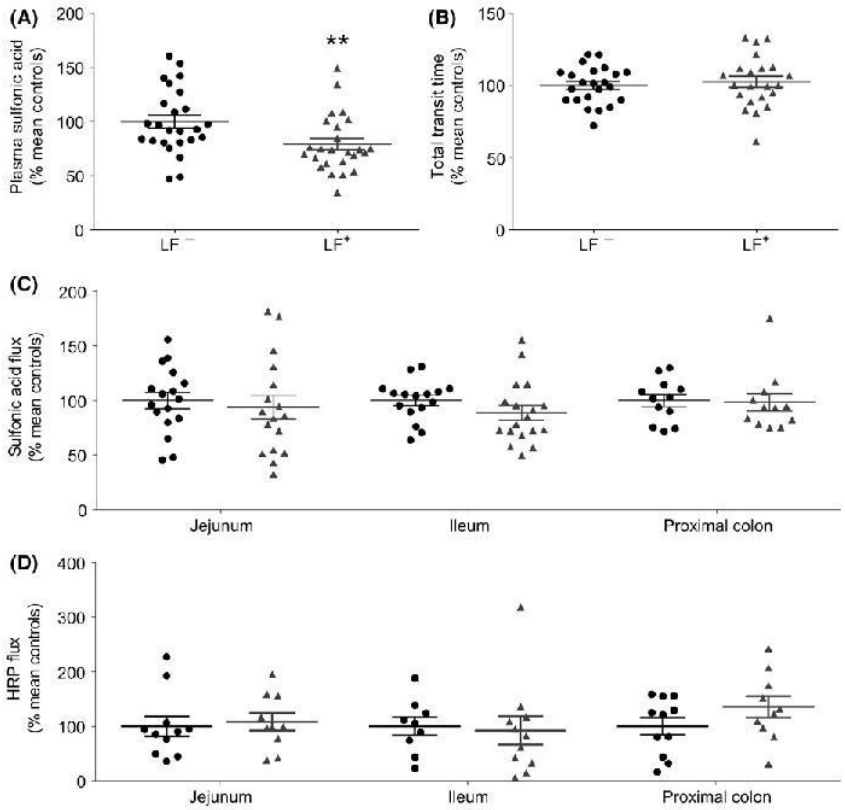


FIGURE 1 Impact of *Lactobacillus fermentum* (LF) administration on gut functions *in vivo* and on intestinal permeability *ex vivo* at postnatal day 21 A, data show decreased *in vivo* intestinal permeability to fluorescein sulfonic acid (FSA) in LF^+ pups as compared to LF^- pups, one hour after the administration of the marker of permeability (n=25). B, *L. fermentum* administration did not modify total transit time (n=25). C and D, Ussing chambers measurement of mucosal-to-serosal permeability to FSA (n=12-18) and horseradish peroxidase (HRP) (n=9-11) were similar between LF^- pups (filled circles) and LF^+ pups (filled triangles) in the jejunum, ileum and proximal colon. Data are expressed as Mean ± SEM. **P<.01, Mann–Whitney test.

increased at T4 h (+41.63%, P<.05, n=12) and remained increased until T8 h (+77.58%, P<.05, n=12) as compared to non-MS counterparts (Figure 2A). In contrast, at T4 h and T8 h, MS did not significantly increase permeability to FSA in LF^+ pups as compared to their non-MS counterparts (+17.96%, P>.05 and +30.65%, P>.05, respectively, n=12) (Figure 2A). Analysis of the area under the curve (AUC) of permeability to FSA over 24 hours showed that LF^- had enhanced intestinal permeability after MS (+56.90%, P<.001, n=12) (Figure 2B). However, in LF^+ pups, MS failed to increase AUC of intestinal permeability to FSA as compared to their non-MS counterparts (+23.58%, P>.05, n=12) (Figure 2B). Furthermore, following MS, AUC of permeability to FSA was significantly lower in LF^+ as compared to LF^- pups (−20.76%, P<.05, n=12) (Figure 2B).

Next, we aimed to determine whether *L. fermentum* modulated MS-induced changes in plasma levels of corticosterone. At PND 10, LF^- and LF^+ pups exhibited similar corticosterone concentrations (Figure 2C). MS significantly increased plasma corticosterone levels in LF^-(+123.02%, P<0.01, n=12) but not in LF^+ pups (+32.11%, P>.05, n=12) (Figure 2C).

3.4 | *L. fermentum* reduces WAS-induced changes in intestinal permeability and corticosteronemia

In PND-20 LF^- pups, WAS significantly increased *in vivo* permeability to FSA at T4 h as compared to non-WAS counterparts (+71.51%, P<.001, n=6) (Figure 2D). In contrast, at T4 h, WAS did not increase permeability to FSA in LF^+ pups as compared to non-WAS counterparts (+32.46%, P>.05, n=6) (Figure 2D). Analysis of the AUC of permeability to FSA over 24 hours showed that LF^- had increased intestinal permeability after WAS (+42.37%, P<.05, n=6) (Figure 2E). However, in LF^+ pups, WAS failed to increase the AUC of intestinal permeability to FSA as compared to their non-WAS counterparts (+35.95%, P>.05, n=6) (Figure 2E). Furthermore, following WAS, AUC of permeability to FSA was significantly lower in LF^+ pups as compared to LF^- pups (−27.86%, P<.05, n=6) (Figure 2E).

At PND 20, LF^- and LF^+ exhibited similar corticosterone concentrations (Figure 2F). Interestingly, WAS significantly increased plasma corticosterone levels in LF^- pups (+120.17%, P<.01, n=6) but not in LF^+ pups (+31.42%, P>.05, n=6) (Figure 2F).

3.5 | *L. fermentum* decreases *ex vivo* permeability in the small intestine but not in the colon following WAS

We next aimed to assess *ex vivo* whether *L. fermentum* modulated changes in permeability to FSA and HRP in specific regions of the intestinal tract, i.e. jejunum, ileum, and proximal colon.

After WAS, in 21-PND rat pups, permeability to FSA in the jejunum and ileum was significantly lower in the LF^+ group as compared to the LF^- group (−33%, P<.001, n=16-17 and -18%, P<.05, n=17, respectively) but no difference was observed between LF^- and LF^+ pups in the proximal colon (Figure 3A). In addition, permeability to HRP in

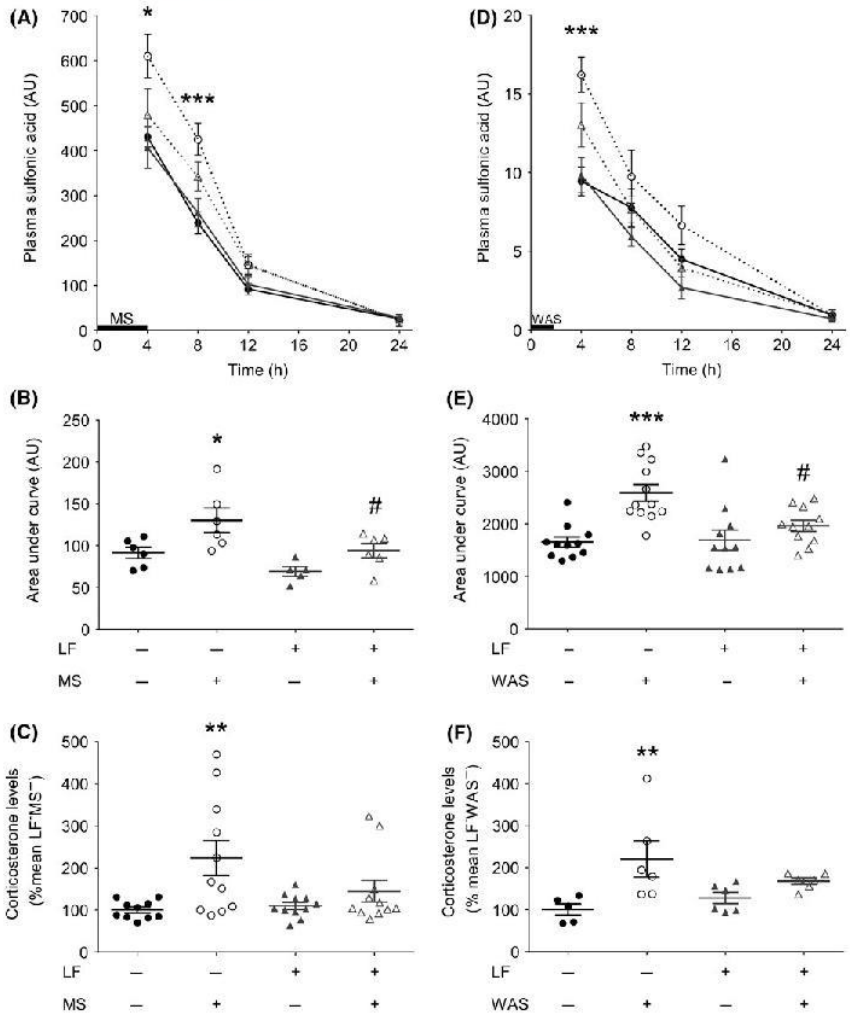


FIGURE 2 Intestinal permeability and plasma corticosterone levels in postnatal day (PND)-10 rat pups subjected to a 4 hour-maternal separation stress (MS^+) or not (MS^-) and in PND-20 rat pups subjected to a 2 hour-water avoidance stress (WAS^+) or not (WAS^-), following supplementation of *Lactobacillus fermentum* (LF^+) or not (LF^-). A, time course of intestinal permeability as determined by plasma fluorescein sulphonic acid (FSA) concentration measured 4-24 hours after oral gavage of rat pups at PND 10 (n=12), LF^-MS^- (filled circles), LF^-MS^+ (empty circles), LF^+MS^- (filled triangles), LF^+MS^+ (empty triangles). D, time course of intestinal permeability as determined by plasma FSA concentration measured 4-24 hours after oral gavage of rat pups at PND 20 (n=6), LF^-WAS^- (filled circles), LF^-WAS^+ (empty circles), LF^+WAS^- (filled triangles), LF^+WAS^+ (empty triangles). B and E, the analysis of the AUC reveals that *L. fermentum* administration prevented the stress-induced increase in intestinal permeability both in PND 10 and PND 20 rat pups, respectively. C and F, MS and WAS induced a significant increase in plasma corticosterone levels in LF^- but not in LF^+ pups. Data are expressed as mean±SEM. *P<.05, **P<.01, ***P<.001 compared to corresponding non-stressed counterparts, #P<.05 compared to LF^-MS^+ group in (B), #P<.05 compared to LF^-WAS^+ group in (E), two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test.

ileum was significantly reduced in LF^+ pups as compared to LF^- pups (−41%, P<.01, n=16) (Figure 3B) and tended to be decreased in jejunum (−31%, P=.09, n=15-17) (Figure 3B). Again, no difference in HRP flux was observed between LF^- and LF^+ pups in the proximal colon.

3.6 | *L. fermentum* modulates ZO-1 expression and prevents WAS-induced ZO-1 reorganization in the ileum

We next assessed the impact of *L. fermentum* and WAS upon the organization and distribution of the key tight junction-associated protein ZO-1 in intestinal epithelial cells of the ileum.

Using quantitative imaging analysis, we first evaluated the length of ZO-1 stained pericellular segments. The mean length of segments was similar between LF^- pups and LF^+ pups. However, WAS significantly decreased the length of segments (−50.26%, P<.05, n=6) in LF^- pups as compared to their non-WAS counterparts (Table 2). Interestingly, *L. fermentum* prevented the WAS-induced decrease in the length of segments (Table 2).

Next, we analyzed the intensity of ZO-1 stained segments and intersections as an index of ZO-1 protein expression at the bicellular and tricellular TJ respectively. WAS did not change the intensity of ZO-1 staining in segments and intersections (Table 2) as compared to non-WAS counterparts (Figures 4A and B). However, under basal

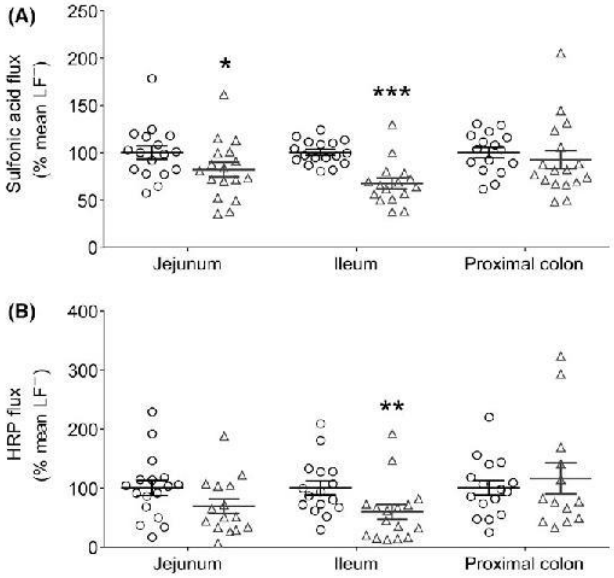


FIGURE 3 *Ex vivo* permeability of intestinal segments after a 2 hour-water avoidance stress in postnatal day-21 rat pups supplemented with *Lactobacillus fermentum* (LF^+) or not (LF^-). A and B, Ussing chambers measurements of mucosal-to-serosal permeability to fluorescein sulphonic acid (FSA) (n=15-17 per group) and horseradish peroxidase (HRP) (n=13-17 per group) reveal decreased permeability to both FSA and HRP permeability in the ileum and decreased permeability only to FSA but not to HRP in the jejunum of LF^+ pups (empty triangles) as compared to LF^- pups (empty circles). Permeability to FSA and HRP were similar between LF^+ and LF^- pups in the proximal colon. Data are expressed as mean±SEM. *P<.05, **P<.01, ***P<.001, Mann–Whitney test.

conditions, ZO-1 intensity was significantly increased in LF^+ pups both in segments and intersections as compared to LF^- pups (+31.33% and +23.00%, respectively, P<.05, n=6) (Figure 4C, Table 2). Furthermore, following WAS, ZO-1 intensity in segments and intersections was increased in LF^+ pups as compared to LF^- pups (segments: +35.36%, intersections: +31.79%, P<.05, n=6) (Figure 4D, Table 2). However, using WB analysis and qPCR neither WAS nor *L. fermentum* modulated ZO-1 protein expression and mRNA expression in ileal segments (Table 2).

3.7 | *L. fermentum* promotes a Th1-oriented immune response in splenocytes

To investigate putative effects of *L. fermentum* on systemic inflammation, representative Th1 and Th2 cytokines (IFNγ and IL-4, respectively) were assayed in the supernatant of anti-CD3/CD28 activated splenocytes isolated from 21-PND pups. Following anti-CD3/CD28 stimulation, IFNγ concentration was significantly greater in LF^+ pups as compared to LF^- pups (+85.53%, P<.01, n=14-15) (Figure 5A). Furthermore, following anti-CD3/CD28, the levels of IL-4 were increased in LF^- pups (P<.01, n=15) but not in LF^+ pups (P>.05, n=15) (Figure 5B).

3.8 | *L. fermentum* increases exploratory behavior of rat pups

Finally, we aimed to determine the ability of *L. fermentum* to modulate behavior by characterizing the response of rat pups in the EPM. The percentage of entries in open and closed arms was similar between LF^- and LF^+ groups (Figures 6A and B). During the first two minutes of the test, LF^- pups and LF^+ pups travelled similar distance (Figure 6C). However, as from the third minute, a significant reduction of the travelled distance was observed for the LF^- group while the LF^+ group maintained a similar distance travelled per minute throughout the test (P<.05, n=6) (Figure 6C). Increased number of rears during the 5 minute-testing period was observed in LF^+ pups as compared to LF^- pups (P < 0.05, n = 6) (Figure 6D).

4 | DISCUSSION

Our study showed that oral administration of *L. fermentum strain CECT 5716* (*L. fermentum*) prevented psychological stress-induced barrier dysfunction in rat pups. In particular, we showed that *L. fermentum* reduced permeability to both, FSA and HRP, in the small intestine (in particular the ileum) but not in the proximal colon. We further showed that *L. fermentum* increased cellular expression of ZO-1 and prevented

TABLE 2 ZO-1 pericellular staining continuity (mean length of segments) and intensity, protein relative expression and mRNA relative expression in the ileum of rat pups subjected to water avoidance stress (WAS^+) or not (WAS^-) following gavage of *Lactobacillus fermentum* (LF^+) or not (LF^-)

	LF^- WAS^-	LF^- WAS^+	LF^+ WAS^-	LF^+WAS^+
Parameter (% mean controls)	Mean±SEM	Mean±SEM	Mean±SEM	Mean±SEM
Mean length of segments	100.00±20.26	50.72*±6.82	89.41±15.37	83.66±11.09
Staining intensity of segments	100.00±3.33	87.67±4.83	131.33†±11.80	118.67‡±11.96
Staining intensity of intersections	100.00±3.50	82.83±4.42	123.00†±8.09	109.17‡±9.06
ZO-1 protein relative expression	100.00±6.76	116.11±12.24	106.44±6.64	91.22±8.70
ZO-1 mRNA relative expression	100.00±5.12	103.22±7.06	97.22±6.93	104.33±5.10

Two-way ANOVA with Bonferroni post-hoc test.
*P<.05 vs LF^- WAS^-.
†P<.05 vs LF^- WAS^-.
‡P<.05 vs LF^- WAS^+.

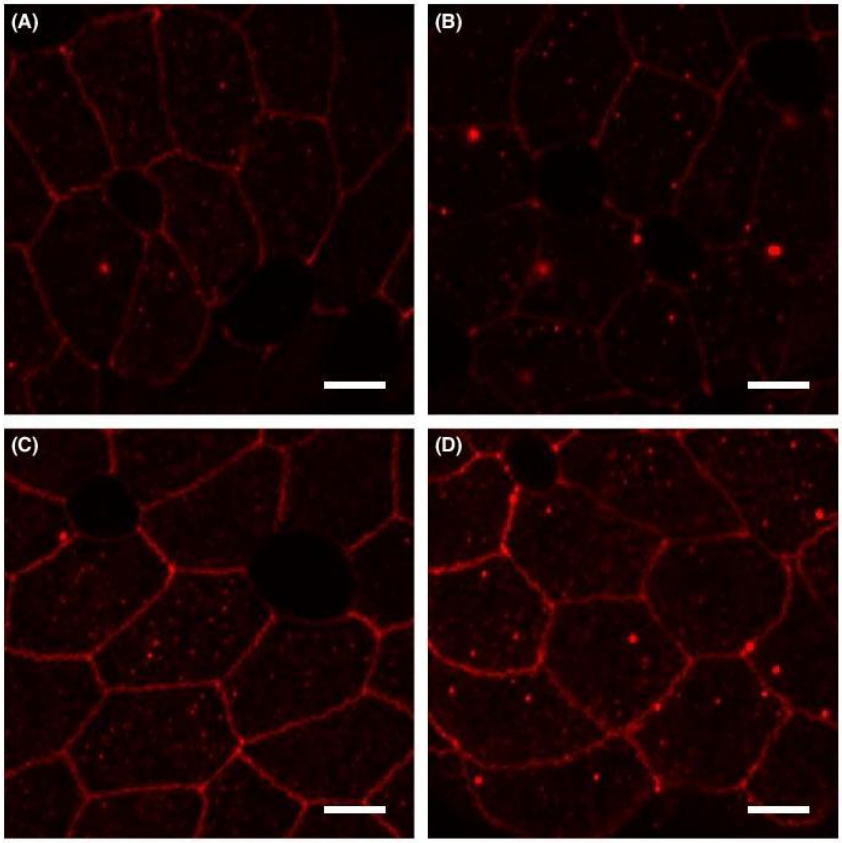


FIGURE 4 Immunofluorescent staining of zonula occludens-1 (ZO-1) in epithelial cells of ileal whole-mounts. *Ex vivo* permeability of intestinal segments after a 2 hour-water avoidance stress (WAS^+) or not (WAS^-) in postnatal day-21 rat pups supplemented with *Lactobacillus fermentum* (LF^+) or not (LF^-). A-D, representative immunofluorescence confocal image of ZO-1 in the ileum of rat pups in LF^-WAS^- (A), LF^-WAS^+ (B), LF^+WAS^- (C), LF^+WAS^+ (D), Scale bar: 5 μm.

WAS-induced ZO-1 disorganization in the ileum. *L. fermentum* significantly reduced stress-induced (WAS and MS) increase in corticosteronemia. We showed enhanced IFNγ but reduced IL-4 production by stimulated splenocytes derived from *L. fermentum* treated pups as compared to controls. Finally, *L. fermentum* increased exploratory behavior as compared to controls. These results suggest that *L. fermentum* could provide a novel tool for the prevention and/or treatment of gastrointestinal disorders associated with altered IEB functions in the newborn.

A major finding of this study was the ability of *L. fermentum*, to prevent changes in intestinal barrier functions induced by acute psychological stressors. In order to demonstrate *L. fermentum* effects, we used different acute psychological stressors (WAS and MS) in rat pups which increased intestinal permeability together with an increase in corticosteronemia. These findings were consistent with previous studies reporting an increase in intestinal permeability and corticosteronemia in rats pups following MS [9] or in adult rats following WAS.[45,47] Furthermore, the increase in intestinal permeability induced by the different stressors was associated with alterations in organization and distribution of ZO-1. Consistently, genetic deletion of ZO-1 in intestinal epithelial cells increases paracellular permeability.[48] Although never identified in the newborn, similar changes in ZO-1 distribution has been reported in adult rats subjected to acute immobilization stress.[49] These acute stress-induced alterations in tight junction distribution may result from changes in cytoskeleton organization or post-traductional modifications of ZO-1 [50, 51] rather from a loss of mRNA or protein expression.[49]

Another important finding of our study was to identify the small intestine as a major target of *L. fermentum* effects. Indeed, following acute stress, *L. fermentum* reduced the permeability to FSA and to HRP in the small intestine, and in particular in the ileum, but not in the colon. However, no significant decrease in permeability (P=.12) in the small intestine was detected *ex vivo* under basal conditions. This could be due to the fact that the amplitude of changes in permeability to FSA induced by *L fermentum* is at the limit of detection of the Ussing chambers. The underlying mechanism for this region-specific targeting by *L. fermentum* remains currently unknown. To the best of our knowledge, although no region-specific action of probiotics upon permeability have been reported previously, such differences were observed for GI motility. Indeed, Wu and colleagues showed that different strains of probiotic (*Lactobacillus rhamnosus* (*JB-1*) or *Lactobacillus reuteri* (*DSM 17938*)) had differential effects upon migrating motor complex in the small intestine and colon.[52] For instance, while *JB-1* increased velocity of migrating motor complexes in the jejunum, the latter were reduced in the colon by *JB-1*. Concerning modulation of IEB functions by probiotics, previous studies have shown that strains such as *B. lactis CNCM I-2494* and *Lactobacillus farciminis* can prevent stress-induced increase in permeability in adults.[45,53,54] However, our study is the only one showing that a probiotic can reduce simultaneously permeability to both small and large molecules in the newborn in response to an acute

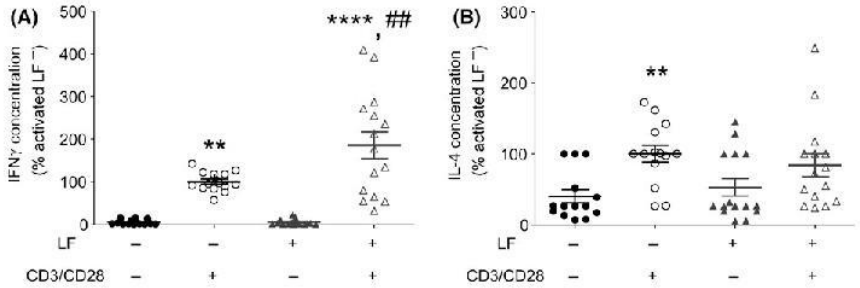


FIGURE 5 Cytokines levels in the supernatant of stimulated splenocytes from postnatal day-21 rat pups supplemented with *Lactobacillus fermentum* (LF^+) or not (LF^-). A, analysis of the levels of IFNγ and IL-4 in the supernatant of anti-CD3/CD28 activated splenocytes reveals an increase in IFNγ levels which was significantly higher in LF^+ rat pups as compared to LF^- pups (n=14-15 per group). B, anti-CD3/CD28 induced a significant increase in IL-4 levels in LF^- but not in LF^+ pups (n=14-15 per group). Data are expressed as Mean±SEM. $^{**}P<.01$, $^{****}P<.0001$, compared to corresponding non-stimulated group, $^{\#\#}P<.01$ compared to LF^- stimulated group, two-way ANOVA with Bonferroni *post hoc* test.

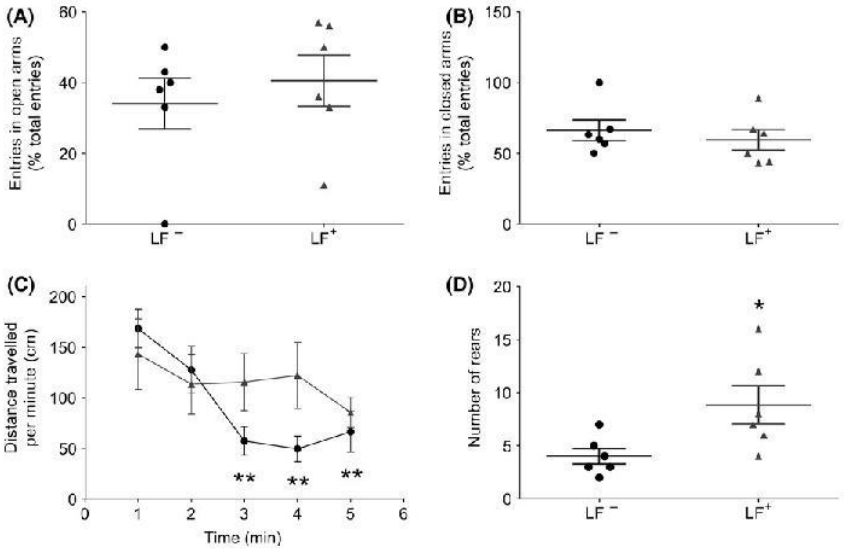


FIGURE 6 Assessment of rat pups behavior supplemented with *Lactobacillus fermentum* (LF^+) or not (LF^-) using the Elevated Plus Maze (EPM) test. A, entries in open arms (% of total entries). B, entries in closed arms (% of total entries). C, distance travelled per minute during the 5 minutes of the testing session, LF^- (filled circles), LF^+ (filled triangles). Distance travelled during the last 3 minutes was significantly reduced in LF^- pups but not LF^+ pups as compared to its initial value (i.e. during the first minute) (n=6 per group). D, number of rears was significantly larger in LF^+ pups as compared to LF^- pups. $^{**}P<.01$ compared to the distance travelled during the first minute in (C), $^{*}P<.05$ compared to LF^- group in (D), Mann–Whitney test.

psychological stress. However, it remains currently to be determined whether changes in permeability to HRP are reflecting changes in transcellular or paracellular permeability, especially during the post-natal period when paracellular permeability is significantly increased.[9] Similar studies in the newborn using probiotics have focused rather on the ability of probiotics to protect the IEB from chronic MS stress or inflammatory insults. For instance, in neonatal rat pups subjected to chronic MS, probiotic administration ameliorated MS-induced increase in HRP in the colon.[55] In neonatal rodent NEC models, administration of probiotic strains such as *Bifidobacterium bifidum* and *Bifidobacterium infantis* decreased intestinal permeability through normalization of either expression or localization of TJ proteins.[12,13]

Although the mechanisms responsible for *L. fermentum* mediated reduction in permeability to FSA and HRP remain unknown, they probably combine direct effects upon intestinal epithelial cells and also indirect ones on the activation of HPA axis. Indeed, *L. fermentum* increased *in vivo* ZO-1 expression in intestinal epithelial cells, which could ultimately contribute in part to the reduction of stress-induced changes in ZO-1 redistribution. Consistently, a previous study has shown that increased expression of ZO-1 induced by a probiotic was associated with increased barrier effects.[56] However, we did not measure any change in ZO-1 mRNA or protein expression in the whole ileal tissue. This could be due to the fact that, in whole tissue samples, we also measured the contribution of other cells present expressing ZO-1 such as endothelial cells. Besides ZO-1, whether other tight junction-associated proteins could be modulated by *L. fermentum* but remain to be studied. For instance, pretreatment with *L. reuteri I5007* was shown to increase not only ZO-1 but also claudin-1 and occludin levels in the jejunum and ileum of newborn pigs.[57] Administration of *L. plantarum* into the duodenum of healthy human volunteers was also shown

to increase ZO-1 and occludin levels in the TJ of the small intestine.[58] Besides modulating ZO-1 expression, *L. fermentum* was also shown to reduce stress-induced increase in corticosteronemia. Such findings concur with other studies in which other strains have demonstrated similar action upon HPA axis response to stress. For instance, administration of *L. farciminis* attenuated HPA response to acute stress in adult rats.[45] Similarly, treatment with a combination of *L. helveticus R0052* and *B. longum R0175* also reduced HPA response to chronic stress.[54] Mechanisms responsible for the modulation of HPA activity by *L. fermentum* remain unknown but could involve, for instance, a modulation of CRF dependent pathways. Indeed, a recent study has demonstrated the ability of a probiotic strain, *L. farciminis*, to decrease hypothalamic CRF mRNA in chronically stressed rodents.[45]

A secondary objective of this study was to determine whether *L fermentum* could modulate the immune system. For this purpose, we studied the production of two key cytokines representative of a Th1 and Th2 response from splenocytes following T cell activation. We chose to limit the study of key cytokines such as IFNγ, a marker of Th1 response and IL-4, a marker of Th2 response. Future studies would gain in studying more extensively larger profiles of cytokines and chimiokines and in investigating the impact of *L. fermentum* on immune cells derived from gut-associated lymphoid tissue and mesenteric lymphoid ganglia. Following *L. fermentum* administration, activated splenocytes released larger amounts of IFNγ than activated splenocytes from controls. Conversely, activation of splenocytes increased IL-4 release in controls but not in *L. fermentum* treated rat pups. Our results are consistent with previous studies in which consumption of *L. fermentum CECT5716* was associated with enhanced production of Th1 cytokines by mice spleen cells.[34] Similar effects of other lactic acid bacteria which increased Th1 cytokines production in splenocytes has been reported in adult animal models.[59,60] Whether such changes observed in the newborn are maintained over time remains to be determined. This would in turn contribute to the preventive effect of *L. fermentum* for developing Th2-driven pathologies such as allergies and/or asthma.

Besides modulating systemic immune response, our study also revealed that chronic *L. fermentum* administration modified behavior patterns in rat pups as measured using EPM. Although we did not observe changes in anxiety-like behavior, as indicated by similar percentage of entries in open and closed arms between conditions, we did however show that *L. fermentum* increased exploratory behavior during the 5-min testing period. Typically, rats exposed to a novel environment display initial high levels of exploratory behavior (i.e. novelty period), followed by a progressive reduction in exploratory activity that occurs as the novel environment becomes familiar (i.e. habituation phase).[61,62] Our results showed that locomotor activity was unchanged during the test period in rat pups treated with *L. fermentum* suggesting increased exploratory behavior as compared to control pups. In addition, *L. fermentum* increased rearing activity of rat pups which reflects interest in the novelty of the environment.[62] The importance of microbiota in exploratory behavior has been demonstrated in antibiotic-treated adult mice [63] but, to the best of our knowledge, the impact of a single probiotic on this behavior has never been reported in newborn rats. However, in view of the small-sized samples, further studies with larger samples should be performed in the future to confirm the data obtained in combination with additional tests. The absence of effect of *L. fermentum* upon anxiety-like behavior found in our study could result from an already low anxiety level of newborn rat pups.[64] It could also result from a selective effect of *L. fermentum* on exploratory activity while sparing the anxiety-like behavior. Indeed, these two types of behavior have been shown to be dissociated in mice lacking the serotoninergic receptor 5-HT_{5A} which displayed increased exploratory activity but no change in anxiety-related behavior.[33]

In conclusion, *L. fermentum* could provide a novel tool for the prevention and/or treatment of gastrointestinal disorders associated with altered intestinal epithelial barrier functions in the newborn.

CONFLICT OF INTEREST

The INSERM U1235 is or has conducted studies in collaboration with companies including Danone Research, PileJe.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

T.V., P.A., and M.N. contributed to the study concept and design. T.V., PA.G., P.A., T.D., and A.F. performed experiments. T.V., H.B., P.H., P.PG., and F.D. analyzed data. T.V., M.N., H.B., and P.N. interpreted data. T.V., A.L., P.LR., and M.N. coordinated the study. T.V., H.B., and M.N. contributed to manuscript writing. All authors contributed to the critical revision and approved the final version of the manuscript. The authors had complete access to the data that supports the publication.

ACKNOWLEDGMENTS

The authors are indebted to Julie Jaulin and Julien Chevalier for help in functional explorations, to Dr Antoine Louveau for help in design of behavioral studies, to Edwige Jardin and Catherine Ferey for characterizing the viability of *L. fermentum* and to Isabelle Cuinet for the supply of the strain.

REFERENCES

1. Matamoros S, Gras-Leguen C, Le Vacon F, Potel G, de La Cochetiere M-F. Development of intestinal microbiota in infants and its impact on health. *Trends Microbiol.* 2013;21:167-173.
2. Neu J. Gastrointestinal maturation and implications for infant feeding. *Early Human Dev.* 2007;83:767-775.
3. Renz H, Brandtzaeg P, Hornef M. The impact of perinatal immune development on mucosal homeostasis and chronic inflammation. *Nat Rev Immunol.* 2011;12:9-23.
4. Roberts RR, Ellis M, Gwynne RM, et al. The first intestinal motility patterns in fetal mice are not mediated by neurons or interstitial cells of Cajal. *J Physiol.* 2010;588:1153-1169.
5. Vries Pd, Soret R, Suply E, Heloury Y, Neunlist M. Postnatal development of myenteric neurochemical phenotype and impact on neuromuscular transmission in the rat colon. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2010;299:G539-G547.

6. Catassi C, Bonucci A, Coppa GV, Carlucci A, Giorgi PL. Intestinal permeability changes during the first month: effect of natural versus artificial feeding. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1995;21:383-386.
7. Vukavić T. Timing of the gut closure. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1984;3:700-703.
8. Weaver LT, Laker MF, Nelson R. Intestinal permeability in the newborn. *Arch Dis Child*. 1984;59:236-241.
9. Moussaoui N, Braniste V, Ait-Belgnaoui A, et al. Changes in intestinal glucocorticoid sensitivity in early life shape the risk of epithelial barrier defect in maternal-deprived rats. *PLoS ONE*. 2014;9:e88382.
10. Patel RM, Myers LS, Kurundkar AR, Maheshwari A, Nusrat A, Lin PW. Probiotic bacteria induce maturation of intestinal claudin 3 expression and barrier function. *Am J Pathol*. 2012;180:626-635.
11. Holmes JL, Van Itallie CM, Rasmussen JE, Anderson JM. Claudin profiling in the mouse during postnatal intestinal development and along the gastrointestinal tract reveals complex expression patterns. *Gene Expr Patterns*. 2006;6:581-588.
12. Bergmann KR, Liu SXL, Tian R, et al. Bifidobacteria stabilize claudins at tight junctions and prevent intestinal barrier dysfunction in mouse necrotizing enterocolitis. *Am J Pathol*. 2013;182:1595-1606.
13. Khailova L, Dvorak K, Arganbright KM, et al. Bifidobacterium bifidum improves intestinal integrity in a rat model of necrotizing enterocolitis. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2009;297:G940-G949.
14. AlFaleh K, Anabrees J. Probiotics for prevention of necrotizing enterocolitis in preterm infants. *Cochrane Database Syst Rev*. 2014;4:CD005496.
15. Israel E. Neonatal necrotizing enterocolitis, a disease of the immature intestinal mucosal barrier. *Acta Paediatr*. 1994;83:27-32.
16. Hommel KA, Denson LA, Crandall WV, Mackner LM. Behavioral functioning and treatment adherence in pediatric inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2008;4:785-791.
17. Dupont C, Barau E, Molkhou P, Raynaud F, Barbet JP, Dehennin L. Food-induced alterations of intestinal permeability in children with cow's milk-sensitive enteropathy and atopic dermatitis. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 1989;8:459-465.
18. Kalach N, Rocchiccioli F, de Boissieu D, Benhamou PH, Dupont C. Intestinal permeability in children: variation with age and reliability in the diagnosis of cow's milk allergy. *Acta Paediatr*. 2001;90:499-504.
19. Molodecky NA, Kaplan GG. Environmental risk factors for inflammatory bowel disease. *Gastroenterol Hepatol (N Y)*. 2010;6:339-346.
20. Pohl CS, Medland JE, Moeser AJ. Early-life stress origins of gastrointestinal disease: animal models, intestinal pathophysiology, and translational implications. *American Journal of Physiology - Gastrointestinal and Liver Physiology*. 2015;309:G927-G941.
21. Bischoff SC, Barbara G, Buurman W, et al. Intestinal permeability – a new target for disease prevention and therapy. *BMC Gastroenterol*. 2014;14:189.
22. Lopetuso LR, Scaldaferri F, Bruno G, Petito V, Franceschi F, Gasbarrini A. The therapeutic management of gut barrier leaking: the emerging role for mucosal barrier protectors. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2015;19:1068-1076.
23. Neurath MF, Travis SPL. Mucosal healing in inflammatory bowel diseases: a systematic review. *Gut*. 2012;61:1619-1635.
24. O' Mahony SM, Stilling RM, Dinan TG, Cryan JF. The microbiome and childhood diseases: focus on brain-gut axis. *Birth Defect Res C*. 2015;105:296-313.
25. Fox AC, McConnell KW, Yoseph BP, et al. The endogenous bacteria alter gut epithelial apoptosis and decrease mortality following Pseudomonas aeruginosa pneumonia. *Shock*. 2012;38:508-514.
26. Lomasney KW, Houston A, Shanahan F, Dinan TG, Cryan JF, Hyland NP. Selective influence of host microbiota on cAMP-mediated ion transport in mouse colon. *Neurogastroenterol Motil*. 2014;26:887-890.
27. Heyman M, Crain-Denoyelle AM, Corthier G, Morgat JL, Desjeux JF. Postnatal development of protein absorption in conventional and germ-free mice. *Am J Physiol*. 1986;251:G326-G331.
28. Stratiki Z, Costalos C, Sevastiadou S, et al. The effect of a bifidobacter supplemented bovine milk on intestinal permeability of preterm infants. *Early Human Dev*. 2007;83:575-579.
29. Madsen K, Cornish A, Soper P, et al. Probiotic bacteria enhance murine and human intestinal epithelial barrier function. *Gastroenterology*. 2001;121:580-591.
30. Martín R, Olivares M, Marín ML, Fernández L, Xaus J, Rodríguez JM. Probiotic potential of 3 Lactobacilli strains isolated from breast milk. *J Hum Lact*. 2005;21:8-17.
31. Gil-Campos M, López MÁ, Rodriguez-Benítez MV, et al. Lactobacillus fermentum CECT 5716 is safe and well tolerated in infants of 1–6 months of age: a randomized controlled trial. *Pharmacol Res*. 2012;65:231-238.
32. Maldonado J, Cañabate F, Sempere L, et al. Human milk probiotic Lactobacillus fermentum CECT5716 reduces the incidence of gastrointestinal and upper respiratory tract infections in infants. *J Pediatr Gastroenterol Nutr*. 2012;54:55-61.
33. Olivares M, Díaz-Ropero Mp, Martín R, Rodríguez Jm, Xaus J. Antimicrobial potential of four Lactobacillus strains isolated from breast milk. *J Appl Microbiol*. 2006;101:72-79.
34. Díaz-Ropero Mp, Martín R, Sierra S, et al. Two Lactobacillus strains, isolated from breast milk, differently modulate the immune response. *J Appl Microbiol*. 2007;102:337-343.
35. Olivares M, Díaz-Ropero MP, Sierra S, et al. Oral intake of Lactobacillus fermentum CECT5716 enhances the effects of influenza vaccination. *Nutrition*. 2007;23:254-260.
36. Estanislau C, Morato S. Behavior ontogeny in the elevated plus-maze: prenatal stress effects. *Int J Dev Neurosci*. 2006;24:255-262.
37. Lynn DA, Brown GR. The ontogeny of anxiety-like behavior in rats from adolescence to adulthood. *Dev Psychobiol*. 2010;52:731-739.
38. Almeida SS, Garcia RA, Cibien MRR, et al. The ontogeny of exploratory behaviors inearly-protein-malnourished rats exposed to the elevated plus-maze test. *Psychobiology*. 1994;22:283-288.
39. Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, et al. Fiji - an open source platform for biological image analysis. *Nat Methods*. 2012;9:676-682.
40. Sato Y, Nakajima S, Shiraga N, et al. Three-dimensional multi-scale line filter for segmentation and visualization of curvilinear structures in medical images. *Med Image Anal*. 1998;2:143-168.
41. Arganda-Carreras I, Fernández-González R, Muñoz-Barrutia A, Ortiz-De-Solorzano C. 3D reconstruction of histological sections: application to mammary gland tissue. *Microsc Res Tech*. 2010;73:1019-1029.
42. Lee T-C, Kashyap RL, Chu C-N. Building skeleton models via 3-D medial surface/axis thinning algorithms. *Comput Vis Graph Image Process*. 1994;56:462-478.
43. Brégeon J, Coron E, Da Silva ACC, et al. Sacral nerve stimulation enhances early intestinal mucosal repair following mucosal injury in a pig model. *J Physiol*. 2016;594:4309-4323.
44. Clairembault T, Leclair-Visonneau L, Coron E, et al. Structural alterations of the intestinal epithelial barrier in Parkinson's disease. *Acta Neuropathol Commun*. 2015;3. doi:10.1186/s40478-015-0196-0.
45. Ait-Belgnaoui A, Durand H, Cartier C, et al. Prevention of gut leakiness by a probiotic treatment leads to attenuated HPA response to an acute psychological stress in rats. *Psychoneuroendocrinology*. 2012;37:1885-1895.
46. Kuge T, Greenwood-Van Meerveld B, Sokabe M. Stress-induced breakdown of intestinal barrier function in the rat: reversal by wood creosote. *Life Sci* 2006;79:913-918.
47. Saunders PR, Santos J, Hanssen NPM, Yates D, Groot JA, Perdue MH. Physical and psychological stress in rats enhances colonic epithelial permeability via peripheral CRH. *Dig Dis Sci*. 2002;47:208-215.

48. Pochard C, Coquenlorge S, Jaulin J, et al. Defects in 15-HETE production and control of epithelial permeability by human enteric glial cells from patients with Crohn's disease. *Gastroenterology*. 2016;150:168-180.
49. Mazzon E, Sturniolo GC, Puzzolo D, Frisina N, Fries W. Effect of stress on the paracellular barrier in the rat ileum. *Gut*. 2002;51:507-513.
50. Ait-Belgnaoui A, Han W, Lamine F, et al. Lactobacillus farciminis treatment suppresses stress induced visceral hypersensitivity: a possible action through interaction with epithelial cell cytoskeleton contraction. *Gut*. 2006;55:1090-1094.
51. Miyauchi E, Morita H, Tanabe S. Lactobacillus rhamnosus alleviates intestinal barrier dysfunction in part by increasing expression of zonula occludens-1 and myosin light-chain kinase *in vivo*. *J Dairy Sci*. 2009;92:2400-2408.
52. Wu RY, Pasyk M, Wang B, et al. Spatiotemporal maps reveal regional differences in the effects on gut motility for Lactobacillus reuteri and rhamnosus strains. *Neurogastroenterol Motil*. 2013;25:e205-e214.
53. Agostini S, Goubern M, Tondereau V, et al. A marketed fermented dairy product containing Bifidobacterium lactis CNCM I-2494 suppresses gut hypersensitivity and colonic barrier disruption induced by acute stress in rats. *Neurogastroenterol Motil*. 2012;24:376-e172.
54. Da Silva S, Robbe-Masselot C, Ait-Belgnaoui A, et al. Stress disrupts intestinal mucus barrier in rats via mucin O-glycosylation shift: prevention by a probiotic treatment. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2014;307:G420-G429.
55. Gareau MG, Jury J, MacQueen G, Sherman PM, Perdue MH. Probiotic treatment of rat pups normalises corticosterone release and ameliorates colonic dysfunction induced by maternal separation. *Gut*. 2007;56:1522-1528.
56. Ukena SN, Singh A, Dringenberg U, et al. Probiotic Escherichia coli Nissle 1917 inhibits leaky gut by enhancing mucosal integrity. *PLoS ONE*. 2007;2:e1308.
57. Yang F, Wang A, Zeng X, Hou C, Liu H, Qiao S. Lactobacillus reuteri I5007 modulates tight junction protein expression in IPEC-J2 cells with LPS stimulation and in newborn piglets under normal conditions. *BMC Microbiol*. 2015;15:32.
58. Karczewski J, Troost FJ, Konings I, et al. Regulation of human epithelial tight junction proteins by Lactobacillus plantarum *in vivo* and protective effects on the epithelial barrier. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol*. 2010;298:G851-G859.
59. Dimitrijevic R, Ivanovic N, Mathiesen G, et al. Effects of Lactobacillus rhamnosus LA68 on the immune system of C57BL/6 mice upon oral administration. *J Dairy Res*. 2014;81:202-207.
60. Maroof H, Hassan ZM, Mobarez AM, Mohamadabadi MA. Lactobacillus acidophilus could modulate the immune response against breast cancer in murine model. *J Clin Immunol*. 2012;32:1353-1359.
61. Arentsen T, Raith H, Qian Y, Forssberg H, Heijtz RD. Host microbiota modulates development of social preference in mice. *Microb Ecol Health Dis*. 2015;26:29719.
62. Walf AA, Frye CA. The use of the elevated plus maze as an assay of anxiety-related behavior in rodents. *Nat Protoc*. 2007;2:322-328.
63. Bercik P, Park AJ, Sinclair D, et al. The anxiolytic effect of Bifidobacterium longum NCC3001 involves vagal pathways for gut–brain communication. *Neurogastroenterol Motil*. 2011;23:1132-1139.
64. Smith KS, Morrell JI. Comparison of infant and adult rats in exploratory activity, diurnal patterns, and responses to novel and anxiety-provoking environments. *Behav Neurosci*. 2007;121:449-461.
65. Grailhe R, Waeber C, Dulawa SC, et al. Increased exploratory activity and altered response to LSD in mice lacking the 5-HT5A receptor. *Neuron*. 1999;22:581-591.

SUPPORTING INFORMATION

Additional Supporting Information may be found online in the supporting information tab for this article.

How to cite this article: Vanhaecke T, Aubert P, Grohard P-A, et al. *L. fermentum CECT 5716* prevents stress-induced intestinal barrier dysfunction in newborn rats. *Neurogastroenterol Motil*. 2017;00:e13069. https://doi.org/10.1111/nmo.13069

Références

A

Abbott, N. J., Patabendige, A. A. K., Dolman, D. E. M., Yusof, S. R. and Begley, D. J. (2010) 'Structure and function of the blood–brain barrier', *Neurobiology of Disease*, 37(1), pp. 13–25. doi: 10.1016/j.nbd.2009.07.030.

Agrawal, S., Anderson, P., Durbeej, M., van Rooijen, N., Ivars, F., Opdenakker, G. and Sorokin, L. M. (2006) 'Dystroglycan is selectively cleaved at the parenchymal basement membrane at sites of leukocyte extravasation in experimental autoimmune encephalomyelitis', *The Journal of Experimental Medicine*, 203(4), pp. 1007–1019. doi: 10.1084/jem.20051342.

Aharoni, R., Sasson, E., Blumenfeld-Katzir, T., Eilam, R., Sela, M., Assaf, Y. and Arnon, R. (2013) 'Magnetic resonance imaging characterization of different experimental autoimmune encephalomyelitis models and the therapeutic effect of glatiramer acetate', *Experimental Neurology*, 240, pp. 130–144. doi: 10.1016/j.expneurol.2012.11.004.

Ajami, B., Bennett, J. L., Krieger, C., McNagny, K. M. and Rossi, F. M. V (2011) 'Infiltrating monocytes trigger EAE progression, but do not contribute to the resident microglia pool', *Nature Neuroscience*, 14(9), pp. 1142–1149. doi: 10.1038/nn.2887.

Amato, M. P., Zipoli, V., Goretti, B., Portaccio, E., De Caro, M. F., Ricchiuti, L., Siracusa, G., Masini, M., Sorbi, S. and Trojano, M. (2006) 'Benign multiple sclerosis: cognitive, psychological and social aspects in a clinical cohort.', *Journal of neurology*, 253(8), pp. 1054–9. doi: 10.1007/s00415-006-0161-8.

von Andrian, U. H. and Engelhardt, B. (2003) 'α_4 Integrins as Therapeutic Targets in Autoimmune Disease', *New England Journal of Medicine*, 348(1), pp. 68–72. doi: 10.1056/NEJMe020157.

Antoni, L., Nuding, S., Wehkamp, J. and Stange, E. F. (2014) 'Intestinal barrier in inflammatory bowel disease.', *World journal of gastroenterology*. Baishideng Publishing Group Inc, 20(5), pp. 1165–79. doi: 10.3748/wjg.v20.i5.1165.

Arihiro, S., Ohtani, H., Suzuki, M., Murata, M., Ejima, C., Oki, M., Kinouchi, Y., Fukushima, K., Sasaki, I., Nakamura, S., Matsumoto, T., Torii, A., Toda, G. and Nagura, H. (no date) 'Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease.', *Pathology international*, 52(5–6), pp. 367–74. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12100519 (Accessed: 22 June 2017).

Ascherio, A., Munger, K. L. and Lünemann, J. D. (2012) 'The initiation and prevention of multiple sclerosis.', *Nature reviews. Neurology*, 8(11), pp. 602–12. doi: 10.1038/nrneurol.2012.198.

Ashwell, J. D., DeFranco, A. L., Paul, W. E. and Schwartz, R. H. (1984) 'Antigen presentation by resting B cells. Radiosensitivity of the antigen-presentation function and two distinct pathways of T cell activation.', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 159(3), pp. 881–905. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6607969 (Accessed: 25 April 2017).

Aziz, M., Stivaros, S., Fagbemi, A. and Vassallo, G. (2013) 'Acute disseminated encephalomyelitis in conjunction with inflammatory bowel disease', *European Journal of Paediatric Neurology*, 17(2), pp. 208–211. doi: 10.1016/j.ejpn.2012.06.007.

B

Bechmann, I., Galea, I. and Perry, V. H. (2007) 'What is the blood-brain barrier (not)?', *Trends in immunology*, 28(1), pp. 5–11. doi: 10.1016/j.it.2006.11.007.

Belliere, J., Martinez de Lizarrondo, S., Choudhury, R. P., Quenault, A., Le Béhot, A., Delage, C., Chauveau, D., Schanstra, J. P., Bascands, J.-L., Vivien, D. and Gauberti, M. (2015) 'Unmasking Silent Endothelial Activation in the Cardiovascular System Using Molecular Magnetic Resonance Imaging.', *Theranostics*. Ivyspring International Publisher, 5(11), pp. 1187–202. doi: 10.7150/thno.11835.

Berer, K., Mues, M., Koutrolos, M., Rasbi, Z. Al, Boziki, M., Johner, C., Wekerle, H. and Krishnamoorthy, G. (2011) 'Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination.', *Nature*, 479(7374), pp. 538–41. doi: 10.1038/nature10554.

van den Berg, B., Walgaard, C., Drenthen, J., Fokke, C., Jacobs, B. C. and van Doorn, P. A. (2014) 'Guillain–Barré syndrome: pathogenesis, diagnosis, treatment and prognosis', *Nature Reviews Neurology*, 10(8), pp. 469–482. doi: 10.1038/nrneurol.2014.121.

Bettelli, E., Sullivan, B., Szabo, S. J., Sobel, R. A., Glimcher, L. H. and Kuchroo, V. K. (2004) 'Loss of T-bet, But Not STAT1, Prevents the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis', *The Journal of Experimental Medicine*, 200(1), pp. 79–87. doi: 10.1084/jem.20031819.

Bhasin, M., Wu, M. and Tsirka, S. E. (2007) 'Modulation of microglial/macrophage activation by macrophage inhibitory factor (TKP) or tuftsin (TKPR) attenuates the disease course of experimental autoimmune encephalomyelitis.', *BMC immunology*, 8(1), p. 10. doi: 10.1186/1471-2172-8-10.

Biber, A., Englert, D., Dommasch, D. and Hempel, K. (1981) 'Myelin basic protein in cerebrospinal fluid of patients with multiple sclerosis and other neurological diseases.', *Journal of neurology*, 225(4), pp. 231–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6169802 (Accessed: 15 May 2017).

Bogie, J. F. J., Stinissen, P. and Hendriks, J. J. A. (2014) 'Macrophage subsets and microglia in multiple sclerosis', *Acta Neuropathologica*. Springer Berlin Heidelberg, 128(2), pp. 191–213. doi: 10.1007/s00401-014-1310-2.

Borregaard, N., Christensen, L., Bejerrum, O. W., Birgens, H. S. and Clemmensen, I. (1990) 'Identification of a highly mobilizable subset of human neutrophil intracellular vesicles that contains tetranectin and latent alkaline phosphatase.', *The Journal of clinical investigation*. American Society for Clinical Investigation, 85(2), pp. 408–16. doi: 10.1172/JCI114453.

Bot, J. C. J., Barkhof, F., Polman, C. H., Lycklama à Nijeholt, G. J., de Groot, V., Bergers, E., Ader, H. J. and Castelijns, J. A. (2004) 'Spinal cord abnormalities in recently diagnosed MS patients: added value of spinal MRI examination.', *Neurology*, 62(2), pp. 226–33. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14745058 (Accessed: 17 May 2017).

Breckwoldt, M. O., Chen, J. W., Stangenberg, L., Aikawa, E., Rodriguez, E., Qiu, S., Moskowitz, M. A. and Weissleder, R. (2008) 'Tracking the inflammatory response in stroke in vivo by sensing the enzyme myeloperoxidase.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 105(47), pp. 18584–9. doi: 10.1073/pnas.0803945105.

Buckley, C. E., Goldsmith, P. and Franklin, R. J. M. (2008) 'Zebrafish myelination: a transparent model for remyelination?', *Disease models & mechanisms*. Company of Biologists, 1(4–5), pp. 221–8. doi: 10.1242/dmm.001248.

von Büdingen, H., Harrer, M. D., Kuenzle, S., Meier, M. and Goebels, N. (2008) 'Clonally expanded plasma cells in the cerebrospinal fluid of MS patients produce myelin-specific antibodies', *European Journal of Immunology*, 38(7), pp. 2014–2023. doi: 10.1002/eji.200737784.

C

Carman, C. V, Sage, P. T., Sciuto, T. E., de la Fuente, M. A., Geha, R. S., Ochs, H. D., Dvorak, H. F., Dvorak, A. M. and Springer, T. A. (2007) 'Transcellular diapedesis is initiated by invasive podosomes.', *Immunity*. NIH Public Access, 26(6), pp. 784–97. doi: 10.1016/j.immuni.2007.04.015.

Chapon, C., Franconi, F., Lacoeuille, F., Hindré, F., Saulnier, P., Benoit, J.-P., Le Jeune, J.-J. and Lemaire, L. (2009) 'Imaging E-selectin expression following traumatic brain injury in the rat using a targeted USPIO contrast agent.', *Magma (New York, N.Y.)*. Inserm, 22(3), pp. 167–74. doi: 10.1007/s10334-008-0161-z.

Chen, R. L., Kassem, N. A., Redzic, Z. B., Chen, C. P. C., Segal, M. B. and Preston, J. E. (2009) 'Age-related changes in choroid plexus and blood-cerebrospinal fluid barrier function in the sheep.', *Experimental gerontology*, 44(4), pp. 289–96. doi: 10.1016/j.exger.2008.12.004.

Comabella, M., Montalban, X., Münz, C. and Lünemann, J. D. (2010) 'Targeting dendritic cells to treat multiple sclerosis', *Nature Reviews Neurology*. doi: 10.1038/nrneurol.2010.112.

Compston, A. and Coles, A. (2002) 'Multiple sclerosis', *The Lancet*, 359(9313), pp. 1221–1231. doi: 10.1016/S0140-6736(02)08220-X.

Corot, C., Petry, K. G., Trivedi, R., Saleh, A., Jonkmanns, C., Le Bas, J.-F., Blezer, E., Rausch, M., Brochet, B., Foster-Gareau, P., Balériaux, D., Gaillard, S. and Dousset, V. (2004) 'Macrophage imaging in central nervous system and in carotid atherosclerotic plaque using ultrasmall superparamagnetic iron oxide in magnetic resonance imaging.', *Investigative radiology*, 39(10), pp. 619–25. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15377941 (Accessed:

29 May 2017).

D

Damkier, H. H., Brown, P. D. and Praetorius, J. (2013) 'Cerebrospinal Fluid Secretion by the Choroid Plexus', *Physiological Reviews*, 93(4), pp. 1847–1892. doi: 10.1152/physrev.00004.2013.

Daneman, R. (2012) 'The blood-brain barrier in health and disease.', *Annals of neurology*, 72(5), pp. 648–72. doi: 10.1002/ana.23648.

Daneman, R., Zhou, L., Kebede, A. A. and Barres, B. A. (2010) 'Pericytes are required for blood-brain barrier integrity during embryogenesis.', *Nature*, 468(7323), pp. 562–6. doi: 10.1038/nature09513.

Dean, G. and Elian, M. (1997) 'Age at immigration to England of Asian and Caribbean immigrants and the risk of developing multiple sclerosis.', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*, 63(5), pp. 565–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9408093 (Accessed: 18 April 2017).

Deloire-Grassin, M. S., Brochet, B., Quesson, B., Delalande, C., Dousset, V., Canioni, P. and Petry, K. G. (2000) 'In vivo evaluation of remyelination in rat brain by magnetization transfer imaging.', *Journal of the neurological sciences*, 178(1), pp. 10–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11018243 (Accessed: 22 May 2017).

Demeestere, D., Libert, C. and Vandenbroucke, R. E. (2015) 'Clinical implications of leukocyte infiltration at the choroid plexus in (neuro)inflammatory disorders.', *Drug discovery today*, 20(8), pp. 928–41. doi: 10.1016/j.drudis.2015.05.003.

Dendrou, C. A., Fugger, L. and Friese, M. A. (2015) 'Immunopathology of multiple sclerosis', *Nature Reviews Immunology*, 15(9), pp. 545–558. doi: 10.1038/nri3871.

Dittel, B. N., Visintin, I., Merchant, R. M. and Janeway, C. A. (1999) 'Presentation of the Self Antigen Myelin Basic Protein by Dendritic Cells Leads to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis', *The Journal of Immunology*, 163(1). Available at: http://www.jimmunol.org/content/163/1/32 (Accessed: 9 May 2017).

Dolapcioglu, C., Guleryuzlu, Y., Uygur-Bayramicli, O., Ahishali, E. and Dabak, R. (2013) 'Asymptomatic Brain Lesions on Cranial Magnetic Resonance Imaging in Inflammatory Bowel Disease', *Gut and Liver*, 7(2), pp. 169–174. doi: 10.5009/gnl.2013.7.2.169.

Dominguez-Villar, M., Baecher-Allan, C. M. and Hafler, D. A. (2011) 'Identification of T helper type 1-like, Foxp3+ regulatory T cells in human autoimmune disease.', *Nature medicine*. NIH Public Access, 17(6), pp. 673–5. doi: 10.1038/nm.2389.

Duhamel, G., Callot, V., Decherchi, P., Le Fur, Y., Marqueste, T., Cozzone, P. J. and Kober, F. (2009) 'Mouse lumbar and cervical spinal cord blood flow measurements by arterial spin labeling: Sensitivity optimization and first application', *Magnetic Resonance in Medicine*,

62(2), pp. 430–439. doi: 10.1002/mrm.22015.

E

Engelhardt, B., Carare, R. O., Bechmann, I., Flügel, A., Laman, J. D. and Weller, R. O. (2016) 'Vascular, glial, and lymphatic immune gateways of the central nervous system', *Acta Neuropathologica*, 132(3), pp. 317–338. doi: 10.1007/s00401-016-1606-5.

Engelhardt, B., Vajkoczy, P. and Weller, R. O. (2017) 'The movers and shapers in immune privilege of the CNS', *Nature Immunology*, 18(2), pp. 123–131. doi: 10.1038/ni.3666.

F

Feger, U., Luther, C., Poeschel, S., Melms, A., Tolosa, E. and Wiendl, H. (2007) 'Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients.', *Clinical and experimental immunology*. Wiley-Blackwell, 147(3), pp. 412–8. doi: 10.1111/j.1365-2249.2006.03271.x.

Feng, D., Nagy, J. A., Pyne, K., Dvorak, H. F. and Dvorak, A. M. (1998) 'Neutrophils emigrate from venules by a transendothelial cell pathway in response to FMLP.', *The Journal of experimental medicine*, 187(6), pp. 903–15. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9500793 (Accessed: 11 May 2017).

Filippi, M., Rocca, M. A., Barkhof, F., Brück, W., Chen, J. T., Comi, G., DeLuca, G., De Stefano, N., Erickson, B. J., Evangelou, N., Fazekas, F., Geurts, J. J., Lucchinetti, C., Miller, D. H., Pelletier, D., Popescu, B. F. G., Lassmann, H. and Attendees of the Correlation between Pathological MRI findings in MS workshop (2012) 'Association between pathological and MRI findings in multiple sclerosis', *The Lancet Neurology*, 11(4), pp. 349–360. doi: 10.1016/S1474-4422(12)70003-0.

Fitzner, D., Schnaars, M., van Rossum, D., Krishnamoorthy, G., Dibaj, P., Bakhti, M., Regen, T., Hanisch, U.-K. and Simons, M. (2011) 'Selective transfer of exosomes from oligodendrocytes to microglia by macropinocytosis.', *Journal of cell science*, 124(Pt 3), pp. 447–58. doi: 10.1242/jcs.074088.

Flach, A.-C., Litke, T., Strauss, J., Haberl, M., Gómez, C. C., Reindl, M., Saiz, A., Fehling, H.-J., Wienands, J., Odoardi, F., Lühder, F. and Flügel, A. (2016) 'Autoantibody-boosted T-cell reactivation in the target organ triggers manifestation of autoimmune CNS disease', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 113(12), pp. 3323–3328. doi: 10.1073/pnas.1519608113.

Fleischman, D., Berdahl, J. P., Zaydlarova, J., Stinnett, S., Fautsch, M. P. and Allingham, R. R. (2012) 'Cerebrospinal fluid pressure decreases with older age.', *PloS one*. Edited by Y. Zheng,

7(12), p. e52664. doi: 10.1371/journal.pone.0052664.

Fréchou, M., Beray-Berthat, V., Raynaud, J.-S., Mériaux, S., Gombert, F., Lancelot, E., Plotkine, M., Marchand-Leroux, C., Ballet, S., Robert, P., Louin, G. and Margaill, I. (2013) 'Detection of vascular cell adhesion molecule-1 expression with USPIO-enhanced molecular MRI in a mouse model of cerebral ischemia', *Contrast Media & Molecular Imaging*, 8(2), pp. 157–164. doi: 10.1002/cmmi.1512.

Freedman, M. S., Thompson, E. J., Deisenhammer, F., Giovannoni, G., Grimsley, G., Keir, G., Öhman, S., Racke, M. K., Sharief, M., Sindic, C. J. M., Sellebjerg, F. and Tourtellotte, W. W. (2005) 'Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis', *Archives of Neurology*, 62(6), pp. 865–70. doi: 10.1001/archneur.62.6.865.

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 : a journal of neurology*, 132(Pt 5), pp. 1175–89. doi: 10.1093/brain/awp070.

Frisullo, G., Nociti, V., Iorio, R., Patanella, A. K., Marti, A., Caggiula, M., Mirabella, M., Tonali, P. A. and Batocchi, A. P. (2008) 'IL17 and IFNγ production by peripheral blood mononuclear cells from clinically isolated syndrome to secondary progressive multiple sclerosis', *Cytokine*, 44(1), pp. 22–25. doi: 10.1016/j.cyto.2008.08.007.

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 (New York, N.Y.)*, 230(4729), pp. 1043–5. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2414848 (Accessed: 16 May 2017).

G

Gaberel, T., Gakuba, C., Goulay, R., Martinez De Lizarrondo, S., Hanouz, J.-L., Emery, E., Touze, E., Vivien, D. and Gauberti, M. (2014) 'Impaired glymphatic perfusion after strokes revealed by contrast-enhanced MRI: a new target for fibrinolysis?', *Stroke*, 45(10), pp. 3092–6. doi: 10.1161/STROKEAHA.114.006617.

Galea, I., Bernardes-Silva, M., Forse, P. A., van Rooijen, N., Liblau, R. S. and Perry, V. H. (2007) 'An antigen-specific pathway for CD8 T cells across the blood-brain barrier', *The Journal of Experimental Medicine*, 204(9), pp. 2023–2030. doi: 10.1084/jem.20070064.

Gauberti, M., Montagne, A., Marcos-Contreras, O. A., Le Behot, A., Maubert, E. and Vivien, D. (2013) 'Ultra-Sensitive Molecular MRI of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Reveals a Dynamic Inflammatory Penumbra After Strokes', *Stroke*, 44(7), pp. 1988–1996. doi: 10.1161/STROKEAHA.111.000544.

Gauberti, M., Montagne, A., Quenault, A. and Vivien, D. (2014) 'Molecular magnetic resonance imaging of brainâ€"immune interactions', *Frontiers in Cellular Neuroscience*, 8, p. 389. doi: 10.3389/fncel.2014.00389.

Ge, S., Song, L. and Pachter, J. S. (2005) 'Where is the blood-brain barrier ? really?', *Journal of Neuroscience Research*, 79(4), pp. 421–427. doi: 10.1002/jnr.20313.

Geissler, A., Andus, T., Roth, M., Kullmann, F., Caesar, I., Held, P., Gross, V., Feuerbach, S. and Schölmerich, J. (1995) 'Focal white-matter lesions in brain of patients with inflammatory bowel disease.', *Lancet (London, England)*, 345(8954), pp. 897–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7707814 (Accessed: 16 May 2017).

Ghosh, S., Goldin, E., Gordon, F. H., Malchow, H. A., Rask-Madsen, J., Rutgeerts, P., Vyhnálek, P., Zádorová, Z., Palmer, T., Donoghue, S. and Natalizumab Pan-European Study Group (2003) 'Natalizumab for Active Crohn's Disease', *New England Journal of Medicine*, 348(1), pp. 24–32. doi: 10.1056/NEJMoa020732.

Gold, S. M. and Voskuhl, R. R. (2009) 'Estrogen and testosterone therapies in multiple sclerosis', in *Progress in brain research*, pp. 239–251. doi: 10.1016/S0079-6123(09)17516-7.

Goldmann, T., Wieghofer, P., Jordão, M. J. C., Prutek, F., Hagemeyer, N., Frenzel, K., Amann, L., Staszewski, O., Kierdorf, K., Krueger, M., Locatelli, G., Hochgerner, H., Zeiser, R., Epelman, S., Geissmann, F., Priller, J., Rossi, F. M. V, Bechmann, I., Kerschensteiner, M., Linnarsson, S., Jung, S. and Prinz, M. (2016) 'Origin, fate and dynamics of macrophages at central nervous system interfaces.', *Nature immunology*. NIH Public Access, 17(7), pp. 797–805. doi: 10.1038/ni.3423.

Goulay, R., Flament, J., Gauberti, M., Naveau, M., Pasquet, N., Gakuba, C., Emery, E., Hantraye, P., Vivien, D., Aron-Badin, R. and Gaberel, T. (2017) 'Subarachnoid Hemorrhage Severely Impairs Brain Parenchymal Cerebrospinal Fluid Circulation in Nonhuman Primate', *Stroke*. doi: 10.1161/STROKEAHA.117.017014.

Goverman, J., Woods, A., Larson, L., Weiner, L. P., Hood, L. and Zaller, D. M. (1993) 'Transgenic mice that express a myelin basic protein-specific T cell receptor develop spontaneous autoimmunity.', *Cell*, 72(4), pp. 551–60. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7679952 (Accessed: 24 May 2017).

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', *Nature Medicine*, 11(3), pp. 328–334. doi: 10.1038/nm1197.

Groschwitz, K. R. and Hogan, S. P. (2009) 'Intestinal barrier function: Molecular regulation and disease pathogenesis', *Journal of Allergy and Clinical Immunology*, 124(1), pp. 3–20. doi: 10.1016/j.jaci.2009.05.038.

Gupta, G., Gelfand, J. M. and Lewis, J. D. (2005) 'Increased Risk for Demyelinating Diseases in Patients With Inflammatory Bowel Disease', *Gastroenterology*, 129(3), pp. 819–826. doi: 10.1053/j.gastro.2005.06.022.

H

Hall, S. M. (1972) 'The effect of injections of lysophosphatidyl choline into white matter of the adult mouse spinal cord.', *Journal of cell science*, 10(2), pp. 535–46. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5018033 (Accessed: 22 May 2017).

Hauser, S. L., Waubant, E., Arnold, D. L., Vollmer, T., Antel, J., Fox, R. J., Bar-Or, A., Panzara, M., Sarkar, N., Agarwal, S., Langer-Gould, A., Smith, C. H. and HERMES Trial Group (2008) 'B-Cell Depletion with Rituximab in Relapsing–Remitting Multiple Sclerosis', *New England Journal of Medicine*, 358(7), pp. 676–688. doi: 10.1056/NEJMoa0706383.

Hawker, K., O'Connor, P., Freedman, M. S., Calabresi, P. A., Antel, J., Simon, J., Hauser, S., Waubant, E., Vollmer, T., Panitch, H., Zhang, J., Chin, P. and Smith, C. H. (2009) 'Rituximab in patients with primary progressive multiple sclerosis: Results of a randomized double-blind placebo-controlled multicenter trial', *Annals of Neurology*, 66(4), pp. 460–471. doi: 10.1002/ana.21867.

Hellings, N., Barée, M., Verhoeven, C., D'hooghe, M. B., Medaer, R., Bernard, C. C. A., Raus, J. and Stinissen, P. (2001) 'T-cell reactivity to multiple myelin antigens iHellings, N., Barée, M., Verhoeven, C., D'hooghe, M. B., Medaer, R., Bernard, C. C. A., … Stinissen, P. (2001). T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy control', *Journal of Neuroscience Research*, 63(3), pp. 290–302. doi: 10.1002/1097-4547(20010201)63:3<290::AID-JNR1023>3.0.CO;2-4.

Henkel, J. S., Beers, D. R., Wen, S., Bowser, R. and Appel, S. H. (2009) 'DECREASED mRNA EXPRESSION OF TIGHT JUNCTION PROTEINS IN LUMBAR SPINAL CORDS OF PATIENTS WITH ALS', *Neurology*, 72(18), pp. 1614–1616. doi: 10.1212/WNL.0b013e3181a41228.

Hertwig, L., Pache, F., Romero-Suarez, S., Stürner, K. H., Borisow, N., Behrens, J., Bellmann-Strobl, J., Seeger, B., Asselborn, N., Ruprecht, K., Millward, J. M., Infante-Duarte, C. and Paul, F. (2016) 'Distinct functionality of neutrophils in multiple sclerosis and neuromyelitis optica', *Multiple Sclerosis Journal*, 22(2), pp. 160–173. doi: 10.1177/1352458515586084.

Hirota, K., Duarte, J. H., Veldhoen, M., Hornsby, E., Li, Y., Cua, D. J., Ahlfors, H., Wilhelm, C., Tolaini, M., Menzel, U., Garefalaki, A., Potocnik, A. J. and Stockinger, B. (2011) 'Fate mapping of IL-17-producing T cells in inflammatory responses', *Nature Immunology*, 12(3), pp. 255–263. doi: 10.1038/ni.1993.

Höftberger, 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*. Blackwell Publishing Ltd, 14(1), pp. 43–50. doi: 10.1111/j.1750-3639.2004.tb00496.x.

Hohenwalter, E. J. (2009) 'Chronic mesenteric ischemia: diagnosis and treatment.', *Seminars in interventional radiology*. Thieme Medical Publishers, 26(4), pp. 345–51. doi: 10.1055/s-0029-1242198.

Hoyte, L. C., Brooks, K. J., Nagel, S., Akhtar, A., Chen, R., Mardiguian, S., McAteer, M. A., Anthony, D. C., Choudhury, R. P., Buchan, A. M. and Sibson, N. R. (2010) 'Molecular Magnetic

Resonance Imaging of Acute Vascular Cell Adhesion Molecule-1 Expression in a Mouse Model of Cerebral Ischemia', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*. SAGE PublicationsSage UK: London, England, 30(6), pp. 1178–1187. doi: 10.1038/jcbfm.2009.287.

Hu, D., Ikizawa, K., Lu, L., Sanchirico, M. E., Shinohara, M. L. and Cantor, H. (2004) 'Analysis of regulatory CD8 T cells in Qa-1-deficient mice', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 5(5), pp. 516–523. doi: 10.1038/ni1063.

Huang, A. J., Manning, J. E., Bandak, T. M., Ratau, M. C., Hanser, K. R. and Silverstein~, S. C. (no date) 'Endothelial Cell Cytosolic Free Calcium Regulates Neutrophil Migration across Monolayers of Endothelial Cells'. Available at: http://jcb.rupress.org/content/jcb/120/6/1371.full.pdf (Accessed: 11 May 2017).

Huizinga, R., van der Star, B. J., Kipp, M., Jong, R., Gerritsen, W., Clarner, T., Puentes, F., Dijkstra, C. D., van der Valk, P. and Amor, S. (2012) 'Phagocytosis of neuronal debris by microglia is associated with neuronal damage in multiple sclerosis', *Glia*, 60(3), pp. 422–431. doi: 10.1002/glia.22276.

I

Iliff, J. J., Chen, M. J., Plog, B. A., Zeppenfeld, D. M., Soltero, M., Yang, L., Singh, I., Deane, R. and Nedergaard, M. (2014) 'Impairment of glymphatic pathway function promotes tau pathology after traumatic brain injury', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 34(49), pp. 16180–16193. doi: 10.1523/JNEUROSCI.3020-14.2014.

Iliff, J. J., Lee, H., Yu, M., Feng, T., Logan, J., Nedergaard, M. and Benveniste, H. (2013) 'Brain-wide pathway for waste clearance captured by contrast-enhanced MRI', *Journal of Clinical Investigation*, 123(3), pp. 1299–1309. doi: 10.1172/JCI67677.

Iliff, J. J., Wang, M., Liao, Y., Plogg, B. A., Peng, W., Gundersen, G. A., Benveniste, H., Vates, G. E., Deane, R., Goldman, S. A., Nagelhus, E. A. and Nedergaard, M. (2012) 'A paravascular pathway facilitates CSF flow through the brain parenchyma and the clearance of interstitial solutes, including amyloid β.', *Science translational medicine*, 4(147), p. 147ra111. doi: 10.1126/scitranslmed.3003748.

International Multiple Sclerosis Genetics Consortium (IMSGC), A. H., Beecham, A. H., Patsopoulos, N. A., Xifara, D. K., Davis, M. F., Kemppinen, A., Cotsapas, C., Shah, T. S., Spencer, C., Booth, D., Goris, A., Oturai, A., Saarela, J., Fontaine, B., Hemmer, B., Martin, C., Zipp, F., D'Alfonso, S., Martinelli-Boneschi, F., Taylor, B., Harbo, H. F., Kockum, I., Hillert, J., Olsson, T., Ban, M., Oksenberg, J. R., Hintzen, R., Barcellos, L. F., Wellcome Trust Case Control Consortium 2 (WTCCC2), L., International IBD Genetics Consortium (IIBDGC), M., Agliardi, C., Alfredsson, L., Alizadeh, M., Anderson, C., Andrews, R., Søndergaard, H. B., Baker, A., Band, G., Baranzini, S. E., Barizzone, N., Barrett, J., Bellenguez, C., Bergamaschi, L., Bernardinelli, L., Berthele, A., Biberacher, V., Binder, T. M. C., Blackburn, H., Bomfim, I. L., Brambilla, P., Broadley, S., Brochet, B., Brundin, L., Buck, D., Butzkueven, H., Caillier, S. J., Camu, W., Carpentier, W., Cavalla, P., Celius, E. G., Coman, I., Comi, G., Corrado, L., Cosemans, L., Cournu-Rebeix, I., Cree, B. A. C.,

Cusi, D., Damotte, V., Defer, G., Delgado, S. R., Deloukas, P., di Sapio, A., Dilthey, A. T., Donnelly, P., Dubois, B., Duddy, M., Edkins, S., Elovaara, I., Esposito, F., Evangelou, N., Fiddes, B., Field, J., Franke, A., Freeman, C., Frohlich, I. Y., Galimberti, D., Gieger, C., Gourraud, P.-A., Graetz, C., Graham, A., Grummel, V., Guaschino, C., Hadjixenofontos, A., Hakonarson, H., Halfpenny, C., Hall, G., Hall, P., Hamsten, A., Harley, J., Harrower, T., Hawkins, C., Hellenthal, G., Hillier, C., Hobart, J., Hoshi, M., Hunt, S. E., Jagodic, M., Jelčić, I., Jochim, A., Kendall, B., Kermode, A., Kilpatrick, T., Koivisto, K., Konidari, I., Korn, T., Kronsbein, H., Langford, C., Larsson, M., Lathrop, M., Lebrun-Frenay, C., Lechner-Scott, J., Lee, M. H., Leone, M. A., Leppä, V., Liberatore, G., Lie, B. A., Lill, C. M., Lindén, M., Link, J., Luessi, F., Lycke, J., Macciardi, F., Männistö, S., Manrique, C. P., Martin, R., Martinelli, V., Mason, D., Mazibrada, G., McCabe, C., Mero, I.-L., Mescheriakova, J., Moutsianas, L., Myhr, K.-M., Nagels, G., Nicholas, R., Nilsson, P., Piehl, F., Pirinen, M., Price, S. E., Quach, H., Reunanen, M., Robberecht, W., Robertson, N. P., Rodegher, M., Rog, D., Salvetti, M., Schnetz-Boutaud, N. C., Sellebjerg, F., Selter, R. C., Schaefer, C., Shaunak, S., Shen, L., Shields, S., Siffrin, V., Slee, M., Sorensen, P. S., Sorosina, M., Sospedra, M., Spurkland, A., Strange, A., Sundqvist, E., Thijs, V., Thorpe, J., Ticca, A., Tienari, P., van Duijn, C., Visser, E. M., Vucic, S., Westerlind, H., Wiley, J. S., Wilkins, A., Wilson, J. F., Winkelmann, J., Zajicek, J., Zindler, E., Haines, J. L., Pericak-Vance, M. A., Ivinson, A. J., Stewart, G., Hafler, D., Hauser, S. L., Compston, A., McVean, G., De Jager, P., Sawcer, S. J. and McCauley, J. L. (2013) 'Analysis of immune-related loci identifies 48 new susceptibility variants for multiple sclerosis.', *Nature genetics*, 45(11), pp. 1353–60. doi: 10.1038/ng.2770.

J

Jahnke, U., Fischer, E. H. and Alvord, E. C. (1985) 'Sequence homology between certain viral proteins and proteins related to encephalomyelitis and neuritis.', *Science (New York, N.Y.)*, 229(4710), pp. 282–4. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2409602 (Accessed: 16 May 2017).

Jessen, N. A., Munk, A. S. F., Lundgaard, I. and Nedergaard, M. (2015) 'The Glymphatic System: A Beginner's Guide', *Neurochemical Research*, 40(12), pp. 2583–2599. doi: 10.1007/s11064-015-1581-6.

Jiang, Q., Zhang, L., Ding, G., Davoodi-Bojd, E., Li, Q., Li, L., Sadry, N., Nedergaard, M., Chopp, M. and Zhang, Z. (2017) 'Impairment of the glymphatic system after diabetes', *Journal of Cerebral Blood Flow & Metabolism*, 37(4), pp. 1326–1337. doi: 10.1177/0271678X16654702.

Johnston, M., Zakharov, A., Papaiconomou, C., Salmasi, G. and Armstrong, D. (2004) 'Evidence of connections between cerebrospinal fluid and nasal lymphatic vessels in humans, non-human primates and other mammalian species.', *Cerebrospinal fluid research*, 1(1), p. 2. doi: 10.1186/1743-8454-1-2.

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', *The Journal of Immunology*, 160(6). Available at: http://www.jimmunol.org/content/160/6/3056.long (Accessed: 24 April 2017).

K

Kamegawa, A., Hiroaki, Y., Tani, K. and Fujiyoshi, Y. (2016) 'Two-dimensional crystal structure of aquaporin-4 bound to the inhibitor acetazolamide.', *Microscopy (Oxford, England)*. Oxford University Press, 65(2), pp. 177–84. doi: 10.1093/jmicro/dfv368.

van Kasteren, S. I., Campbell, S. J., Serres, S., Anthony, D. C., Sibson, N. R. and Davis, B. G. (2009) 'Glyconanoparticles allow pre-symptomatic in vivo imaging of brain disease.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 106(1), pp. 18–23. doi: 10.1073/pnas.0806787106.

Kaya, F., Mannioui, A., Chesneau, A., Sekizar, S., Maillard, E., Ballagny, C., Houel-Renault, L., Dupasquier, D., Bronchain, O., Holtzmann, I., Desmazieres, A., Thomas, J.-L., Demeneix, B. A., Brophy, P. J., Zalc, B. and Mazabraud, A. (2012) 'Live imaging of targeted cell ablation in Xenopus: a new model to study demyelination and repair.', *The Journal of neuroscience : the official journal of the Society for Neuroscience*. Europe PMC Funders, 32(37), pp. 12885–95. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2252-12.2012.

Kebir, H., Ifergan, I., Alvarez, J. I., Bernard, M., Poirier, J., Arbour, N., Duquette, P. and Prat, A. (2009) 'Preferential recruitment of interferon-γ-expressing T $_{H}$ 17 cells in multiple sclerosis', *Annals of Neurology*, 66(3), pp. 390–402. doi: 10.1002/ana.21748.

Kelly, J. R., Kennedy, P. J., Cryan, J. F., Dinan, T. G., Clarke, G. and Hyland, N. P. (2015) 'Breaking down the barriers: the gut microbiome, intestinal permeability and stress-related psychiatric disorders.', *Frontiers in cellular neuroscience*. Frontiers Media SA, 9, p. 392. doi: 10.3389/fncel.2015.00392.

Kerfoot, S. M. and Kubes, P. (2002) 'Overlapping Roles of P-Selectin and α4 Integrin to Recruit Leukocytes to the Central Nervous System in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis', *The Journal of Immunology*, 169(2). Available at: http://www.jimmunol.org/content/169/2/1000.full (Accessed: 12 May 2017).

Kerfoot, S. M., Norman, M. U., Lapointe, B. M., Bonder, C. S., Zbytnuik, L. and Kubes, P. (2006) 'Reevaluation of P-selectin and alpha 4 integrin as targets for the treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 176(10), pp. 6225–34. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16670333 (Accessed: 11 May 2017).

Kivisäkk, 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(4), pp. 457–69. doi: 10.1002/ana.21379.

Kivisakk, P., Mahad, D. J., Callahan, M. K., Trebst, C., Tucky, B., Wei, T., Wu, L., Baekkevold, E. S., Lassmann, H., Staugaitis, S. M., Campbell, J. J. and Ransohoff, R. M. (2003) 'Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: Evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 100(14), pp. 8389–8394. doi: 10.1073/pnas.1433000100.

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.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 169(9), pp. 4712–6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12391178 (Accessed: 24 April 2017).

Kolaczkowska, E. and Kubes, P. (2013) 'Neutrophil recruitment and function in health and inflammation', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 13(3), pp. 159–175. doi: 10.1038/nri3399.

Komatsu, N., Okamoto, K., Sawa, S., Nakashima, T., Oh-hora, M., Kodama, T., Tanaka, S., Bluestone, J. A. and Takayanagi, H. (2013) 'Pathogenic conversion of Foxp3+ T cells into TH17 cells in autoimmune arthritis', *Nature Medicine*, 20(1), pp. 62–68. doi: 10.1038/nm.3432.

Korn, T., Reddy, J., Gao, W., Bettelli, E., Awasthi, A., Petersen, T. R., Bäckström, B. T., Sobel, R. A., Wucherpfennig, K. W., Strom, T. B., Oukka, M. and Kuchroo, V. K. (no date) 'Myelin-specific regulatory T cells accumulate in the CNS but fail to control autoimmune inflammation'. doi: 10.1038/nm1564.

Kotter, M. R., Setzu, A., Sim, F. J., Van Rooijen, N. and Franklin, R. J. (2001) 'Macrophage depletion impairs oligodendrocyte remyelination following lysolecithin-induced demyelination.', *Glia*, 35(3), pp. 204–12. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11494411 (Accessed: 26 April 2017).

Kress, B. T., Iliff, J. J., Xia, M., Wang, M., Wei, H. S., Zeppenfeld, D., Xie, L., Kang, H., Xu, Q., Liew, J. A., Plog, B. A., Ding, F., Deane, R. and Nedergaard, M. (2014) 'Impairment of paravascular clearance pathways in the aging brain.', *Annals of neurology*, 76(6), pp. 845–61. doi: 10.1002/ana.24271.

Kuenz, B., Lutterotti, A., Khalil, M., Ehling, R., Gneiss, C., Deisenhammer, F., Reindl, M. and Berger, T. (2005) 'Plasma levels of soluble adhesion molecules sPECAM-1, sP-selectin and sE-selectin are associated with relapsing-remitting disease course of multiple sclerosis', *Journal of Neuroimmunology*, 167(1–2), pp. 143–149. doi: 10.1016/j.jneuroim.2005.06.019.

Kutzelnigg, A., Lucchinetti, C. F., Stadelmann, C., Brück, W., Rauschka, H., Bergmann, M., Schmidbauer, M., Parisi, J. E. and Lassmann, H. (2005) 'Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis.', *Brain : a journal of neurology*, 128(Pt 11), pp. 2705–12. doi: 10.1093/brain/awh641.

L

Lachapelle, F., Bachelin, C., Moissonnier, P., Nait-Oumesmar, B., Hidalgo, A., Fontaine, D. and Evercooren, A. B.-V. (2006) 'Failure of Remyelination in the Nonhuman Primate Optic Nerve', *Brain Pathology*. Blackwell Publishing Ltd, 15(3), pp. 198–207. doi: 10.1111/j.1750-3639.2005.tb00521.x.

Ladewig, G., Jestaedt, L., Misselwitz, B., Solymosi, L., Toyka, K., Bendszus, M. and Stoll, G.

(2009) 'Spatial diversity of blood–brain barrier alteration and macrophage invasion in experimental autoimmune encephalomyelitis: A comparative MRI study', *Experimental Neurology*, 220(1), pp. 207–211. doi: 10.1016/j.expneurol.2009.08.027.

Langer-Gould, A., Albers, K., Van Den Eeden, S. and Nelson, L. (2010) 'Autoimmune diseases prior to the diagnosis of multiple sclerosis: a population-based case-control study', *Multiple Sclerosis Journal*, 16(7), pp. 855–861. doi: 10.1177/1352458510369146.

Lankar, D., Briken, V., Adler, K., Weiser, P., Cassard, S., Blank, U., Viguier, M. and Bonnerot, C. (1998) 'Syk tyrosine kinase and B cell antigen receptor (BCR) immunoglobulin-alpha subunit determine BCR-mediated major histocompatibility complex class II-restricted antigen presentation.', *The Journal of experimental medicine*, 188(5), pp. 819–31. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9730884 (Accessed: 25 April 2017).

Laudanna, C., Kim, J. Y., Constantin, G. and Butcher, E. C. (2002) 'Rapid leukocyte integrin activation by chemokines', *Immunological Reviews*. Munksgaard International Publishers, 186(1), pp. 37–46. doi: 10.1034/j.1600-065X.2002.18604.x.

Lécuyer, M.-A., Saint-Laurent, O., Bourbonnière, L., Larouche, S., Larochelle, C., Michel, L., Charabati, M., Abadier, M., Zandee, S., Haghayegh Jahromi, N., Gowing, E., Pittet, C., Lyck, R., Engelhardt, B. and Prat, A. (2017) 'Dual role of ALCAM in neuroinflammation and blood-brain barrier homeostasis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. National Academy of Sciences, 114(4), pp. E524–E533. doi: 10.1073/pnas.1614336114.

Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y. and Mazmanian, S. K. (2011) 'Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis.', *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, (Supplement_1), pp. 4615–22. doi: 10.1073/pnas.1000082107.

Leonetti, C., Macrez, R., Pruvost, M., Hommet, Y., Bronsard, J., Fournier, A., Perrigault, M., Machin, I., Vivien, D., Clemente, D., De Castro, F., Maubert, E. and Docagne, F. (2017) 'Tissue-type plasminogen activator exerts EGF-like chemokinetic effects on oligodendrocytes in white matter (re)myelination', *Molecular Neurodegeneration*, 12(1), p. 20. doi: 10.1186/s13024-017-0160-5.

Ley, K., Laudanna, C., Cybulsky, M. I. and Nourshargh, S. (2007) 'Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated', *Nature Reviews Immunology*. Nature Publishing Group, 7(9), pp. 678–689. doi: 10.1038/nri2156.

Li, L., Zhang, H., Varrin-Doyer, M., Zamvil, S. S. and Verkman, A. S. (2011) 'Proinflammatory role of aquaporin-4 in autoimmune neuroinflammation', *The FASEB Journal*, 25(5), pp. 1556–1566. doi: 10.1096/fj.10-177279.

Longhini, A., von Glehn, F., Brandão, C., de Paula, R. F., Pradella, F., Moraes, A. S., Farias, A. S., Oliveira, E. C., Quispe-Cabanillas, J. G., Abreu, C., Damasceno, A., Damasceno, B. P., Balashov, K. E. and Santos, L. M. (2011) 'Plasmacytoid dendritic cells are increased in cerebrospinal fluid of untreated patients during multiple sclerosis relapse', *Journal of Neuroinflammation*, 8(1), p. 2. doi: 10.1186/1742-2094-8-2.

Lopes Pinheiro, M. A., Kamermans, A., Garcia-Vallejo, J. J., van het Hof, B., Wierts, L., O'Toole, T., Boeve, D., Verstege, M., van der Pol, S. M., van Kooyk, Y., de Vries, H. E. and Unger, W. W.

(2016) 'Internalization and presentation of myelin antigens by the brain endothelium guides antigen-specific T cell migration', *eLife*, 5. doi: 10.7554/eLife.13149.

Lowther, D. E. and Hafler, D. A. (2012) 'Regulatory T cells in the central nervous system', *Immunological Reviews*, 248(1), pp. 156–169. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01130.x.

Lun, M. P., Monuki, E. S. and Lehtinen, M. K. (2015) 'Development and functions of the choroid plexus–cerebrospinal fluid system', *Nature Reviews Neuroscience*, 16(8), pp. 445–457. doi: 10.1038/nrn3921.

M

Mardiguian, S., Serres, S., Ladds, E., Campbell, S. J., Wilainam, P., McFadyen, C., McAteer, M., Choudhury, R. P., Smith, P., Saunders, F., Watt, G., Sibson, N. R. and Anthony, D. C. (2013) 'Anti–IL-17A Treatment Reduces Clinical Score and VCAM-1 Expression Detected by in Vivo Magnetic Resonance Imaging in Chronic Relapsing EAE ABH Mice', *The American Journal of Pathology*, 182(6), pp. 2071–2081. doi: 10.1016/j.ajpath.2013.02.029.

Massena, S., Christoffersson, G., Hjertstrom, E., Zcharia, E., Vlodavsky, I., Ausmees, N., Rolny, C., Li, J.-P. and Phillipson, M. (2010) 'A chemotactic gradient sequestered on endothelial heparan sulfate induces directional intraluminal crawling of neutrophils', *Blood*, 116(11), pp. 1924–1931. doi: 10.1182/blood-2010-01-266072.

Matsushima, G. K. and Morell, P. (2006) 'The Neurotoxicant, Cuprizone, as a Model to Study Demyelination and Remyelination in the Central Nervous System', *Brain Pathology*. Blackwell Publishing Ltd, 11(1), pp. 107–116. doi: 10.1111/j.1750-3639.2001.tb00385.x.

McAteer, M. A., Sibson, N. R., von zur Muhlen, C., Schneider, J. E., Lowe, A. S., Warrick, N., Channon, K. M., Anthony, D. C. and Choudhury, R. P. (2007) 'In vivo magnetic resonance imaging of acute brain inflammation using microparticles of iron oxide', *Nature Medicine*, 13(10), pp. 1253–1258. doi: 10.1038/nm1631.

McCandless, E. E., Piccio, L., Woerner, B. M., Schmidt, R. E., Rubin, J. B., Cross, A. H. and Klein, R. S. (2008) 'Pathological expression of CXCL12 at the blood-brain barrier correlates with severity of multiple sclerosis.', *The American journal of pathology*. American Society for Investigative Pathology, 172(3), pp. 799–808. doi: 10.2353/ajpath.2008.070918.

McDonald, W. I., Compston, A., Edan, G., Goodkin, D., Hartung, H. P., Lublin, F. D., McFarland, H. F., Paty, D. W., Polman, C. H., Reingold, S. C., Sandberg-Wollheim, M., Sibley, W., Thompson, A., van den Noort, S., Weinshenker, B. Y. and Wolinsky, J. S. (2001) 'Recommended diagnostic criteria for multiple sclerosis: guidelines from the International Panel on the diagnosis of multiple sclerosis.', *Annals of neurology*, 50(1), pp. 121–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11456302 (Accessed: 17 May 2017).

McGavern, D. B., Murray, P. D., Rivera-Quiñones, C., Schmelzer, J. D., Low, P. A. and Rodriguez, M. (2000) 'Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple

sclerosis.', *Brain : a journal of neurology*, 123 Pt 3, pp. 519–31. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10686175 (Accessed: 18 May 2017).

McMahon, E. J., Suzuki, K. and Matsushima, G. K. (2002) 'Peripheral macrophage recruitment in cuprizone-induced CNS demyelination despite an intact blood-brain barrier.', *Journal of neuroimmunology*, 130(1–2), pp. 32–45. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12225886 (Accessed: 22 May 2017).

McRae, B. L., Kennedy, M. K., Tan, L. J., Dal Canto, M. C., Picha, K. S. and Miller, S. D. (1992) 'Induction of active and adoptive relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) using an encephalitogenic epitope of proteolipid protein.', *Journal of neuroimmunology*, 38(3), pp. 229–40. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/1376328 (Accessed: 24 May 2017).

Melemenidis, S., Jefferson, A., Ruparelia, N., Akhtar, A. M., Xie, J., Allen, D., Hamilton, A., Larkin, J. R., Perez-Balderas, F., Smart, S. C., Muschel, R. J., Chen, X., Sibson, N. R. and Choudhury, R. P. (2015) 'Molecular Magnetic Resonance Imaging of Angiogenesis *In Vivo* using Polyvalent Cyclic RGD-Iron Oxide Microparticle Conjugates', *Theranostics*, 5(5), pp. 515–529. doi: 10.7150/thno.10319.

Minagar, A. and Alexander, J. S. (2003) 'Blood-brain barrier disruption in multiple sclerosis', *Multiple Sclerosis*, 9(6), pp. 540–549. doi: 10.1191/1352458503ms965oa.

Mohr, D. C., Hart, S. L., Julian, L., Cox, D. and Pelletier, D. (2004) 'Association between stressful life events and exacerbation in multiple sclerosis: a meta-analysis.', *BMJ (Clinical research ed.)*. BMJ Publishing Group, 328(7442), p. 731. doi: 10.1136/bmj.38041.724421.55.

Montagne, A., Barnes, S. R., Sweeney, M. D., Halliday, M. R., Sagare, A. P., Zhao, Z., Toga, A. W., Jacobs, R. E., Liu, C. Y., Amezcua, L., Harrington, M. G., Chui, H. C., Law, M. and Zlokovic, B. V (2015) 'Blood-brain barrier breakdown in the aging human hippocampus.', *Neuron*. NIH Public Access, 85(2), pp. 296–302. doi: 10.1016/j.neuron.2014.12.032.

Montagne, A., Gauberti, M., Macrez, R., Jullienne, A., Briens, A., Raynaud, J.-S., Louin, G., Buisson, A., Haelewyn, B., Docagne, F., Defer, G., Vivien, D. and Maubert, E. (2012) 'Ultra-sensitive molecular MRI of cerebrovascular cell activation enables early detection of chronic central nervous system disorders', *NeuroImage*, 63(2), pp. 760–770. doi: 10.1016/j.neuroimage.2012.07.018.

Mortazavi, M. M., Griessenauer, C. J., Adeeb, N., Deep, A., Bavarsad Shahripour, R., Shahripour, R. B., Loukas, M., Tubbs, R. I. and Tubbs, R. S. (2014) 'The choroid plexus: a comprehensive review of its history, anatomy, function, histology, embryology, and surgical considerations.', *Child's nervous system : ChNS : official journal of the International Society for Pediatric Neurosurgery*, 30(2), pp. 205–14. doi: 10.1007/s00381-013-2326-y.

Muller, W. A. (2003) 'Leukocyte–endothelial-cell interactions in leukocyte transmigration and the inflammatory response', *Trends in Immunology*, 24(6), pp. 326–333. doi: 10.1016/S1471-4906(03)00117-0.

Murray, P. J. and Wynn, T. A. (2011) 'Protective and pathogenic functions of macrophage subsets.', *Nature reviews. Immunology*. NIH Public Access, 11(11), pp. 723–37. doi: 10.1038/nri3073.

N

Nagelhus, E. A., Veruki, M. L., Torp, R., Haug, F. M., Laake, J. H., Nielsen, S., Agre, P. and Ottersen, O. P. (1998) 'Aquaporin-4 water channel protein in the rat retina and optic nerve: polarized expression in Müller cells and fibrous astrocytes', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 18(7), pp. 2506–2519.

Natrajan, M. S., de la Fuente, A. G., Crawford, A. H., Linehan, E., Nuñez, V., Johnson, K. R., Wu, T., Fitzgerald, D. C., Ricote, M., Bielekova, B. and Franklin, R. J. M. (2015) 'Retinoid X receptor activation reverses age-related deficiencies in myelin debris phagocytosis and remyelination.', *Brain : a journal of neurology*. Oxford University Press, 138(Pt 12), pp. 3581–97. doi: 10.1093/brain/awv289.

Neumann, H., Medana, I. M., Bauer, J. and Lassmann, H. (2002) 'Cytotoxic T lymphocytes in autoimmune and degenerative CNS diseases.', *Trends in neurosciences*, 25(6), pp. 313–9. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12086750 (Accessed: 24 April 2017).

Nielsen, S., Nagelhus, E. A., Amiry-Moghaddam, M., Bourque, C., Agre, P. and Ottersen, O. P. (1997) 'Specialized membrane domains for water transport in glial cells: high-resolution immunogold cytochemistry of aquaporin-4 in rat brain', *The Journal of Neuroscience: The Official Journal of the Society for Neuroscience*, 17(1), pp. 171–180.

Nouri, M., Bredberg, A., Weström, B. and Lavasani, S. (2014) 'Intestinal Barrier Dysfunction Develops at the Onset of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis, and Can Be Induced by Adoptive Transfer of Auto-Reactive T Cells', *PLoS ONE*. Edited by J. R. Lees, 9(9), p. e106335. doi: 10.1371/journal.pone.0106335.

Nuyts, A., Lee, W., Bashir-Dar, R., Berneman, Z. and Cools, N. (2013) 'Dendritic cells in multiple sclerosis: key players in the immunopathogenesis, key players for new cellular immunotherapies?', *Multiple Sclerosis Journal*, 19(8), pp. 995–1002. doi: 10.1177/1352458512473189.

O

O'Connor, R. A., Cambrook, H., Huettner, K. and Anderton, S. M. (2013) 'T-bet is essential for Th1-mediated, but not Th17-mediated, CNS autoimmune disease', *European Journal of Immunology*, 43(11), pp. 2818–2823. doi: 10.1002/eji.201343689.

O'Riordan, J. I., Losseff, N. A., Phatouros, C., Thompson, A. J., Moseley, I. F., MacManus, D. G., McDonald, W. I. and Miller, D. H. (1998) 'Asymptomatic spinal cord lesions in clinically isolated optic nerve, brain stem, and spinal cord syndromes suggestive of demyelination.', *Journal of neurology, neurosurgery, and psychiatry*. BMJ Publishing Group, 64(3), pp. 353–7. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9527148 (Accessed: 17 May 2017).

Obermeier, B., Daneman, R. and Ransohoff, R. M. (2013) 'Development, maintenance and

disruption of the blood-brain barrier', *Nature Medicine*, 19(12), pp. 1584–1596. doi: 10.1038/nm.3407.

Oby, E. and Janigro, D. (2006) 'The Blood?Brain Barrier and Epilepsy', *Epilepsia*, 47(11), pp. 1761–1774. doi: 10.1111/j.1528-1167.2006.00817.x.

Ochs, H. D., Bennett, C. L., Christie, J., Ramsdell, F., Brunkow, M. E., Ferguson, P. J., Whitesell, L., Kelly, T. E., Saulsbury, F. T. and Chance, P. F. (2001) 'The immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X-linked syndrome (IPEX) is caused by mutations of FOXP3.', *Nature Genetics*, 27(1), pp. 20–21. doi: 10.1038/83713.

Orihuela, R., McPherson, C. A. and Harry, G. J. (2016) 'Microglial M1/M2 polarization and metabolic states', *British Journal of Pharmacology*, 173(4), pp. 649–665. doi: 10.1111/bph.13139.

Oshio, K., Watanabe, H., Song, Y., Verkman, A. S. and Manley, G. T. (2005) 'Reduced cerebrospinal fluid production and intracranial pressure in mice lacking choroid plexus water channel Aquaporin-1.', *FASEB journal : official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 19(1), pp. 76–8. doi: 10.1096/fj.04-1711fje.

Ousman, S. S. and David, S. (2000) 'Lysophosphatidylcholine induces rapid recruitment and activation of macrophages in the adult mouse spinal cord.', *Glia*, 30(1), pp. 92–104. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10696148 (Accessed: 22 May 2017).

Owens, G. P., Bennett, J. L., Lassmann, H., O'Connor, K. C., Ritchie, A. M., Shearer, A., Lam, C., Yu, X., Birlea, M., DuPree, C., Williamson, R. A., Hafler, D. A., Burgoon, M. P. and Gilden, D. (2009) 'Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid', *Annals of Neurology*, 65(6), pp. 639–649. doi: 10.1002/ana.21641.

P

Pachner, A. R. (2011) 'Experimental models of multiple sclerosis', *Current Opinion in Neurology*, 24(3), pp. 291–299. doi: 10.1097/WCO.0b013e328346c226.

PATERSON, P. Y. (1960) 'Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells.', *The Journal of experimental medicine*. The Rockefeller University Press, 111(1), pp. 119–36. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14430853 (Accessed: 24 May 2017).

Peng, W., Achariyar, T. M., Li, B., Liao, Y., Mestre, H., Hitomi, E., Regan, S., Kasper, T., Peng, S., Ding, F., Benveniste, H., Nedergaard, M. and Deane, R. (2016) 'Suppression of glymphatic fluid transport in a mouse model of Alzheimer's disease.', *Neurobiology of disease*, 93, pp. 215–25. doi: 10.1016/j.nbd.2016.05.015.

Perez-Balderas, F., van Kasteren, S. I., Aljabali, A. A. A., Wals, K., Serres, S., Jefferson, A., Sarmiento Soto, M., Khrapitchev, A. A., Larkin, J. R., Bristow, C., Lee, S. S., Bort, G., De Simone, F., Campbell, S. J., Choudhury, R. P., Anthony, D. C., Sibson, N. R. and Davis, B. G. (2017) 'Covalent assembly of nanoparticles as a peptidase-degradable platform for molecular MRI',

Nature Communications. Nature Publishing Group, 8, p. 14254. doi: 10.1038/ncomms14254.

Phillipson, M., Heit, B., Colarusso, P., Liu, L., Ballantyne, C. M. and Kubes, P. (2006) 'Intraluminal crawling of neutrophils to emigration sites: a molecularly distinct process from adhesion in the recruitment cascade', *The Journal of Experimental Medicine*, 203(12), pp. 2569–2575. doi: 10.1084/jem.20060925.

Pierson, E., Simmons, S. B., Castelli, L. and Goverman, J. M. (2012) 'Mechanisms regulating regional localization of inflammation during CNS autoimmunity', *Immunological Reviews*, 248(1), pp. 205–215. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01126.x.

Pillay, J., den Braber, I., Vrisekoop, N., Kwast, L. M., de Boer, R. J., Borghans, J. A. M., Tesselaar, K. and Koenderman, L. (2010) 'In vivo labeling with 2H2O reveals a human neutrophil lifespan of 5.4 days', *Blood*, 116(4), pp. 625–627. doi: 10.1182/blood-2010-01-259028.

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., Toal, M., Lynn, F., Panzara, M. A., Sandrock, A. W. and AFFIRM Investigators (2006) 'A Randomized, Placebo-Controlled Trial of Natalizumab for Relapsing Multiple Sclerosis', *New England Journal of Medicine*, 354(9), pp. 899–910. doi: 10.1056/NEJMoa044397.

Polman, C. H., Reingold, S. C., Banwell, B., Clanet, M., Cohen, J. A., Filippi, M., Fujihara, K., Havrdova, E., Hutchinson, M., Kappos, L., Lublin, F. D., Montalban, X., O'Connor, P., Sandberg-Wollheim, M., Thompson, A. J., Waubant, E., Weinshenker, B. and Wolinsky, J. S. (2011) 'Diagnostic criteria for multiple sclerosis: 2010 Revisions to the McDonald criteria', *Annals of Neurology*, 69(2), pp. 292–302. doi: 10.1002/ana.22366.

Ponomarev, E. D., Shriver, L. P., Maresz, K. and Dittel, B. N. (2005) 'Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity.', *Journal of neuroscience research*, 81(3), pp. 374–89. doi: 10.1002/jnr.20488.

Popescu, B. F. G. and Lucchinetti, C. F. (2012) 'Pathology of demyelinating diseases.', *Annual review of pathology*, 7(1), pp. 185–217. doi: 10.1146/annurev-pathol-011811-132443.

Powers, W. J., Grubb, R. L., Darriet, D. and Raichle, M. E. (1985) 'Cerebral blood flow and cerebral metabolic rate of oxygen requirements for cerebral function and viability in humans.', *Journal of cerebral blood flow and metabolism : official journal of the International Society of Cerebral Blood Flow and Metabolism*, 5(4), pp. 600–8. doi: 10.1038/jcbfm.1985.89.

Prinz, M., Tay, T. L., Wolf, Y. and Jung, S. (2014) 'Microglia: unique and common features with other tissue macrophages', *Acta Neuropathologica*, 128(3), pp. 319–331. doi: 10.1007/s00401-014-1267-1.

Prockop LD, Naidu KA, Binard JE, R. J. (no date) *Selective permeability of [3H]-D-mannitol and [14C]-carboxyl-inulin across the blood-brain barrier and blood-spinal cord barrier in the rabbit. - PubMed - NCBI*. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8591066 (Accessed: 15 June 2017).

Q

Quenault, A., Martinez de Lizarrondo, S., Etard, O., Gauberti, M., Orset, C., Haelewyn, B., Segal, H. C., Rothwell, P. M., Vivien, D., Touzé, E. and Ali, C. (2017) 'Molecular magnetic resonance imaging discloses endothelial activation after transient ischaemic attack', *Brain*, 140(1), pp. 146–157. doi: 10.1093/brain/aww260.

R

Raine, C. S., Cannella, B., Hauser, S. L. and Genain, C. P. (1999) 'Demyelination in primate autoimmune encephalomyelitis and acute multiple sclerosis lesions: A case for antigen-specific antibody mediation', *Annals of Neurology*. John Wiley & Sons, Inc., 46(2), pp. 144–160. doi: 10.1002/1531-8249(199908)46:2<144::AID-ANA3>3.0.CO;2-K.

Ransohoff, R. M. (2012) 'Animal models of multiple sclerosis: the good, the bad and the bottom line.', *Nature neuroscience*, 15(8), pp. 1074–7. doi: 10.1038/nn.3168.

Ransohoff, R. M. and Engelhardt, B. (2012) 'The anatomical and cellular basis of immune surveillance in the central nervous system', *Nature Reviews Immunology*, 12(9), pp. 623–635. doi: 10.1038/nri3265.

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', *Nature Immunology*, 10(5), pp. 514–523. doi: 10.1038/ni.1716.

Reese, T. S. and Karnovsky, M. J. (1967) 'Fine structural localization of a blood-brain barrier to exogenous peroxidase.', *The Journal of cell biology*, 34(1), pp. 207–17. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6033532 (Accessed: 5 April 2017).

Rennels, M. L., Gregory, T. F., Blaumanis, O. R., Fujimoto, K. and Grady, P. A. (1985) 'Evidence for a "paravascular" fluid circulation in the mammalian central nervous system, provided by the rapid distribution of tracer protein throughout the brain from the subarachnoid space', *Brain Research*, 326(1), pp. 47–63.

Reynolds, P. R., Larkman, D. J., Haskard, D. O., Hajnal, J. V., Kennea, N. L., George, A. J. T. and Edwards, A. D. (2006) 'Detection of Vascular Expression of E-selectin in Vivo with MR Imaging', *Radiology*. Radiological Society of North America, 241(2), pp. 469–476. doi: 10.1148/radiol.2412050490.

Rhee, S. H., Pothoulakis, C. and Mayer, E. A. (2009) 'Principles and clinical implications of the brain–gut–enteric microbiota axis', *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology*, 6(5), pp. 306–314. doi: 10.1038/nrgastro.2009.35.

Ross, C. A. and Poirier, M. A. (2004) 'Protein aggregation and neurodegenerative disease.',

Nature medicine, 10 Suppl(7), pp. S10-7. doi: 10.1038/nm1066.

Rothhammer, V., Heink, S., Petermann, F., Srivastava, R., Claussen, M. C., Hemmer, B. and Korn, T. (2011) 'Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of α4 integrin expression during EAE', *The Journal of Experimental Medicine*, 208(12), pp. 2465–2476. doi: 10.1084/jem.20110434.

Ruckh, J. M., Zhao, J.-W., Shadrach, J. L., van Wijngaarden, P., Rao, T. N., Wagers, A. J. and Franklin, R. J. M. (2012) 'Rejuvenation of Regeneration in the Aging Central Nervous System', *Cell Stem Cell*, 10(1), pp. 96–103. doi: 10.1016/j.stem.2011.11.019.

Rumble, J. M., Huber, A. K., Krishnamoorthy, G., Srinivasan, A., Giles, D. A., Zhang, X., Wang, L. and Segal, B. M. (2015) 'Neutrophil-related factors as biomarkers in EAE and MS', *The Journal of Experimental Medicine*, 212(1), pp. 23–35. doi: 10.1084/jem.20141015.

S

Saito, M., Iwawaki, T., Taya, C., Yonekawa, H., Noda, M., Inui, Y., Mekada, E., Kimata, Y., Tsuru, A. and Kohno, K. (2001) 'Diphtheria toxin receptor|[ndash]|mediated conditional and targeted cell ablation in transgenic mice', *Nature Biotechnology*. Nature Publishing Group, 19(8), pp. 746–750. doi: 10.1038/90795.

Sakka, L., Coll, G. and Chazal, J. (2011) 'Anatomy and physiology of cerebrospinal fluid', *European Annals of Otorhinolaryngology, Head and Neck Diseases*, 128(6), pp. 309–316. doi: 10.1016/j.anorl.2011.03.002.

Salinas-González, R., Rodríguez-Sánchez, L., Pelayo-Vergara, R., Benito-Penalva, J., Sibley, W. and Wolinsky, J. (2016) 'Multiple sclerosis following a spinal cord injury: a rare and unfortunate case', *Spinal Cord Series and Cases*. Nature Publishing Group, 1(1), p. 15027. doi: 10.1038/scsandc.2015.27.

Sandoval, K. E. and Witt, K. A. (2008) 'Blood-brain barrier tight junction permeability and ischemic stroke', *Neurobiology of Disease*, 32(2), pp. 200–219. doi: 10.1016/j.nbd.2008.08.005.

Sathiyanadan, K., Coisne, C., Enzmann, G., Deutsch, U. and Engelhardt, B. (2014) 'PSGL-1 and E/P-selectins are essential for T-cell rolling in inflamed CNS microvessels but dispensable for initiation of EAE', *European Journal of Immunology*, 44(8), pp. 2287–2294. doi: 10.1002/eji.201344214.

Saunders, N. R., Dreifuss, J.-J., Dziegielewska, K. M., Johansson, P. A., Habgood, M. D., Møllgård, K. and Bauer, H.-C. (2014) 'The rights and wrongs of blood-brain barrier permeability studies: a walk through 100 years of history.', *Frontiers in neuroscience*. Frontiers Media SA, 8, p. 404. doi: 10.3389/fnins.2014.00404.

Savidge, T. C., Newman, P., Pothoulakis, C., Ruhl, A., Neunlist, M., Bourreille, A., Hurst, R. and Sofroniew, M. V. (2007) 'Enteric Glia Regulate Intestinal Barrier Function and Inflammation Via Release of S-Nitrosoglutathione', *Gastroenterology*, 132(4), pp. 1344–1358. doi:

10.1053/j.gastro.2007.01.051.

Savidge, T. C., Sofroniew, M. V and Neunlist, M. (2007) 'Starring roles for astroglia in barrier pathologies of gut and brain', *Laboratory Investigation*. Nature Publishing Group, 87(8), pp. 731–736. doi: 10.1038/labinvest.3700600.

Schemann, M. and Neunlist, M. (2004) 'The human enteric nervous system', *Neurogastroenterology and Motility*. Blackwell Publishing Ltd, 16(s1), pp. 55–59. doi: 10.1111/j.1743-3150.2004.00476.x.

Schenkel, A. R., Mamdouh, Z. and Muller, W. A. (2004) 'Locomotion of monocytes on endothelium is a critical step during extravasation', *Nature Immunology*. Nature Publishing Group, 5(4), pp. 393–400. doi: 10.1038/ni1051.

Serres, S., Mardiguian, S., Campbell, S. J., McAteer, M. A., Akhtar, A., Krapitchev, A., Choudhury, R. P., Anthony, D. C. and Sibson, N. R. (2011) 'VCAM-1-targeted magnetic resonance imaging reveals subclinical disease in a mouse model of multiple sclerosis', *The FASEB Journal*, 25(12), pp. 4415–4422. doi: 10.1096/fj.11-183772.

Setzu, A., Lathia, J. D., Zhao, C., Wells, K., Rao, M. S., ffrench-Constant, C. and Franklin, R. J. M. (2006) 'Inflammation stimulates myelination by transplanted oligodendrocyte precursor cells', *Glia*, 54(4), pp. 297–303. doi: 10.1002/glia.20371.

Shechter, R., Miller, O., Yovel, G., Rosenzweig, N., London, A., Ruckh, J., Kim, K.-W., Klein, E., Kalchenko, V., Bendel, P., Lira, S. A., Jung, S. and Schwartz, M. (2013) 'Recruitment of Beneficial M2 Macrophages to Injured Spinal Cord Is Orchestrated by Remote Brain Choroid Plexus', *Immunity*, 38(3), pp. 555–569. doi: 10.1016/j.immuni.2013.02.012.

Shimizu, F., Sano, Y., Takahashi, T., Haruki, H., Saito, K., Koga, M. and Kanda, T. (2012) 'Sera from neuromyelitis optica patients disrupt the blood–brain barrier', *Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry*, 83(3), pp. 288–297. doi: 10.1136/jnnp-2011-300434.

Souza, H. S., Elia, C. C., Spencer, J. and MacDonald, T. T. (1999) 'Expression of lymphocyte-endothelial receptor-ligand pairs, alpha4beta7/MAdCAM-1 and OX40/OX40 ligand in the colon and jejunum of patients with inflammatory bowel disease.', *Gut*, 45(6), pp. 856–63. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10562584 (Accessed: 22 June 2017).

Steffen, B. J., Breier, G., Butcher, E. C., Schulz, M. and Engelhardt, B. (1996) 'ICAM-1, VCAM-1, and MAdCAM-1 are expressed on choroid plexus epithelium but not endothelium and mediate binding of lymphocytes in vitro.', *The American journal of pathology*. American Society for Investigative Pathology, 148(6), pp. 1819–38. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8669469 (Accessed: 20 June 2017).

Steiner, O., Coisne, C., Cecchelli, R., Boscacci, R., Deutsch, U., Engelhardt, B. and Lyck, R. (2010) 'Differential Roles for Endothelial ICAM-1, ICAM-2, and VCAM-1 in Shear-Resistant T Cell Arrest, Polarization, and Directed Crawling on Blood-Brain Barrier Endothelium', *The Journal of Immunology*, 185(8), pp. 4846–4855. doi: 10.4049/jimmunol.0903732.

Stidworthy, M. F., Genoud, S., Suter, U., Mantei, N. and Franklin, R. J. M. (2006) 'Quantifying the Early Stages of Remyelination Following Cuprizone-induced Demyelination', *Brain Pathology*. Blackwell Publishing Ltd, 13(3), pp. 329–339. doi: 10.1111/j.1750-3639.2003.tb00032.x.

Strazielle, N., Creidy, R., Malcus, C., Boucraut, J. and Ghersi-Egea, J.-F. (2016) 'T-Lymphocytes Traffic into the Brain across the Blood-CSF Barrier: Evidence Using a Reconstituted Choroid Plexus Epithelium.', *PloS one*. Public Library of Science, 11(3), p. e0150945. doi: 10.1371/journal.pone.0150945.

Stromnes, I. M. and Goverman, J. M. (2006) 'Passive induction of experimental allergic encephalomyelitis', *Nature Protocols*, 1(4), pp. 1952–1960. doi: 10.1038/nprot.2006.284.

Suter, T., Biollaz, G., Gatto, D., Bernasconi, L., Herren, T., Reith, W. and Fontana, A. (2003) 'The brain as an immune privileged site: dendritic cells of the central nervous system inhibit T cell activation', *European Journal of Immunology*. WILEY-VCH Verlag, 33(11), pp. 2998–3006. doi: 10.1002/eji.200323611.

Sweeney, M. D., Ayyadurai, S. and Zlokovic, B. V (2016) 'Pericytes of the neurovascular unit: key functions and signaling pathways', *Nature Neuroscience*, 19(6), pp. 771–783. doi: 10.1038/nn.4288.

T

Takeshita, Y. and Ransohoff, R. M. (2012) 'Inflammatory cell trafficking across the blood-brain barrier: chemokine regulation and in vitro models.', *Immunological reviews*. NIH Public Access, 248(1), pp. 228–39. doi: 10.1111/j.1600-065X.2012.01127.x.

Theiler, M. (1937) 'SPONTANEOUS ENCEPHALOMYELITIS OF MICE, A NEW VIRUS DISEASE.', *The Journal of experimental medicine*, 65(5), pp. 705–19. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19870629 (Accessed: 18 May 2017).

Tofts, P. S., Chevassut, T., Cutajar, M., Dowell, N. G. and Peters, A. M. (2011) 'Doubts concerning the recently reported human neutrophil lifespan of 5.4 days', *Blood*, 117(22), pp. 6050–6052. doi: 10.1182/blood-2010-10-310532.

Traka, M., Arasi, K., Avila, R. L., Podojil, J. R., Christakos, A., Miller, S. D., Soliven, B. and Popko, B. (2010) 'A genetic mouse model of adult-onset, pervasive central nervous system demyelination with robust remyelination', *Brain*, 133(10), pp. 3017–3029. doi: 10.1093/brain/awq247.

Trebst, C., Sørensen, T. L., Kivisäkk, P., Cathcart, M. K., Hesselgesser, J., Horuk, R., Sellebjerg, F., Lassmann, H. and Ransohoff, R. M. (2001) 'CCR1+/CCR5+ mononuclear phagocytes accumulate in the central nervous system of patients with multiple sclerosis.', *The American journal of pathology*, 159(5), pp. 1701–10. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11696431 (Accessed: 26 April 2017).

V

Vanhaecke, T., Aubert, P., Grohard, P.-A., Durand, T., Hulin, P., Paul-Gilloteaux, P., Fournier, A., Docagne, F., Ligneul, A., Fressange-Mazda, C., Naveilhan, P., Boudin, H., Le Ruyet, P. and Neunlist, M. (2017) '*L. fermentum CECT 5716* prevents stress-induced intestinal barrier dysfunction in newborn rats', *Neurogastroenterology & Motility*, p. e13069. doi: 10.1111/nmo.13069.

Venkat, P., Chopp, M., Zacharek, A., Cui, C., Zhang, L., Li, Q., Lu, M., Zhang, T., Liu, A. and Chen, J. (2017) 'White matter damage and glymphatic dysfunction in a model of vascular dementia in rats with no prior vascular pathologies', *Neurobiology of Aging*, 50, pp. 96–106. doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2016.11.002.

Venken, K., Hellings, N., Broekmans, T., Hensen, K., Rummens, J.-L. and 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.', *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)*, 180(9), pp. 6411–20. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18424765 (Accessed: 24 April 2017).

Voskuhl, R. R. and Gold, S. M. (2012) 'Sex-related factors in multiple sclerosis susceptibility and progression', *Nature Reviews Neurology*, 8(5), pp. 255–263. doi: 10.1038/nrneurol.2012.43.

W

Wang, M., Ding, F., Deng, S., Guo, X., Wang, W., Iliff, J. J. and Nedergaard, M. (2017) 'Focal Solute Trapping and Global Glymphatic Pathway Impairment in a Murine Model of Multiple Microinfarcts', *The Journal of Neuroscience*, 37(11), pp. 2870–2877. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2112-16.2017.

Warren, K. G., Catz, I. and McPherson, T. A. (1983) 'CSF myelin basic protein levels in acute optic neuritis and multiple sclerosis.', *The Canadian journal of neurological sciences. Le journal canadien des sciences neurologiques*, 10(4), pp. 235–8. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/6197151 (Accessed: 15 May 2017).

Weise, G. and Stoll, G. (2012) 'Magnetic resonance imaging of blood brain/nerve barrier dysfunction and leukocyte infiltration: closely related or discordant?', *Frontiers in neurology*. Frontiers Media SA, 3, p. 178. doi: 10.3389/fneur.2012.00178.

Westall, F. C. (2006) 'Molecular mimicry revisited: gut bacteria and multiple sclerosis.', *Journal of clinical microbiology*. American Society for Microbiology (ASM), 44(6), pp. 2099–104. doi: 10.1128/JCM.02532-05.

Winkler, E. A., Bell, R. D. and Zlokovic, B. V (2011) 'Central nervous system pericytes in health and disease.', *Nature neuroscience*, 14(11), pp. 1398–405. doi: 10.1038/nn.2946.

Wirtz, S., Neufert, C., Weigmann, B. and Neurath, M. F. (2007) 'Chemically induced mouse models of intestinal inflammation', *Nature Protocols*, 2(3), pp. 541–546. doi: 10.1038/nprot.2007.41.

X-Y-Z

Xu, H., Manivannan, A., Goatman, K. A., Jiang, H.-R., Liversidge, J., Sharp, P. F., Forrester, J. V and Crane, I. J. (2003) 'Reduction in shear stress, activation of the endothelium, and leukocyte priming are all required for leukocyte passage across the blood--retina barrier', *Journal of Leukocyte Biology*, 75(2), pp. 224–232. doi: 10.1189/jlb.1002479.

Yednock, T. A., Cannon, C., Fritz, L. C., Sanchez-Madrid, F., Steinman, L. and Karin, N. (1992) 'Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against α4βl integrin', *Nature*, 356(6364), pp. 63–66. doi: 10.1038/356063a0.

Zhong, Z., Deane, R., Ali, Z., Parisi, M., Shapovalov, Y., O'Banion, M. K., Stojanovic, K., Sagare, A., Boillee, S., Cleveland, D. W. and Zlokovic, B. V (2008) 'ALS-causing SOD1 mutants generate vascular changes prior to motor neuron degeneration', *Nature Neuroscience*, 11(4), pp. 420–422. doi: 10.1038/nn2073.

Zlokovic, B. V. (2008) 'The Blood-Brain Barrier in Health and Chronic Neurodegenerative Disorders', *Neuron*, 57(2), pp. 178–201. doi: 10.1016/j.neuron.2008.01.003.