



**HAL**  
open science

# Pathogénicité des lymphocytes T CD4 dérivés de l'intestin dans la sclérose en plaques

Mélanie Nguyen Ky

► **To cite this version:**

Mélanie Nguyen Ky. Pathogénicité des lymphocytes T CD4 dérivés de l'intestin dans la sclérose en plaques. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2021. Français. NNT : 2021BORD0009 . tel-03939528

**HAL Id: tel-03939528**

**<https://theses.hal.science/tel-03939528>**

Submitted on 15 Jan 2023

**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.

THÈSE PRÉSENTÉE  
POUR OBTENIR LE GRADE DE

**DOCTEUR DE**  
**L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX**

ÉCOLE DOCTORALE : Science de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ : Microbiologie-Immunologie

Par Mélanie NGUYEN KY

**Pathogénicité des lymphocytes T CD4 dérivés de l'intestin  
dans la sclérose en plaques**

Sous la direction de : Nathalie SCHMITT

Soutenue le 14 janvier 2021

Membres du jury :

Mr	FAZILLEAU Nicolas	DR INSERM, Toulouse	Rapporteur
Mr	JEGO Gaëtan	MCU, Université de Bourgogne	Rapporteur
Mr	BERARD Frédéric	PU-PH, Université de Lyon	Président
Mme	MICHEL Laure	MCU-PH, Université de Rennes	Examinatrice
Mme	RUET Aurélie	PU-PH, Université de Bordeaux	Examinatrice

# Pathogénicité des lymphocytes LT CD4 dérivés de l'intestin dans la sclérose en plaques

## Résumé :

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire neurodégénérative auto-immune chronique du système nerveux central (SNC). Il n'existe pas de traitement efficace pour les formes les plus invalidantes de la SEP (formes progressives). Les études sur les modèles murins ainsi que sur les échantillons de patients ont établi que les lymphocytes T CD4 (LT CD4) sont une composante immunitaire centrale de la pathogenèse de la SEP. Chez la souris, les altérations de la composition du microbiote intestinal modifient la susceptibilité à la maladie en altérant les propriétés des LT CD4 intestinaux mais également de ceux localisés dans le SNC. Les études réalisées dans des modèles murins de pathologies autoimmunes ayant montré que les lymphocytes intestinaux pouvaient migrer dans les organes cibles et participer à la pathogénèse de ces maladies, nous nous sommes intéressés aux LT CD4 intestinaux et à leur éventuelle pathogénicité chez les patients atteints de SEP. L'obtention d'échantillons de tissus intestinaux chez les patients étant éthiquement difficile, nous avons étudié les caractéristiques des lymphocytes intestinaux à partir de prélèvements sanguins en les identifiant par leur expression de l'intégrine  $\beta 7$ . Nous avons étudié les LT CD4 exprimant l'intégrine  $\beta 7$  (LT CD4 int $\beta 7+$ ) chez les sujets sains. Nous avons observé que les LT CD4 int $\beta 7+$  ont un profil plus inflammatoire comparés aux LT CD4 int $\beta 7-$ . Nous avons également pu mettre en évidence que les LT CD4 folliculaires (TFh) dérivant de l'intestin (TFh int $\beta 7+$ ), induisent une bien plus faible sécrétion d'immunoglobulines G et A, et différenciation des LB naïfs en plasmocytes comparés aux TFh int $\beta 7-$ . Cette différence d'efficacité n'est pas due à une différence de sécrétion d'IL-21 ni à une différence d'expression des molécules de costimulation. Chez les patients SEP, nous avons observé que les TFh int $\beta 7+$  des patients SPMS (phase chronique) mais non RRMS (phase inflammatoire) ont une capacité à aider les LB comparable à celle des TFh int $\beta 7-$  des donneurs sains. Ce résultat suggère que les TFh dérivés de l'intestin pourraient participer à la formation et/ou au maintien des centres germinatifs ectopiques, retrouvés dans les méninges de 40% des patients SPMS et dont la présence corrèle avec la gravité de la maladie. Les études menées *in vitro* ainsi que dans les modèles murins ont montré que les lymphocytes franchissent la barrière hémato-encéphalique (BHE) grâce à l'interaction des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha L\beta 2$  avec leurs ligands respectifs VCAM-1 et ICAM-1 exprimés par les cellules endothéliales. Nous avons observé que les LT CD4 int $\beta 7+$  expriment l'intégrine  $\alpha L\beta 2$  mais aussi de faibles niveaux d'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ . *In vitro*, nous avons déterminé que les LT CD4 int $\beta 7+$  incluant les TFh sont capables de migrer à travers une monocouche de cellules endothéliales de la BHE de manière dépendante de l'interaction  $\alpha L\beta 2/ICAM-1$  et  $\alpha 4\beta 1/VCAM-1$ . Parmi les sous populations de LT CD4, nous avons déterminé que ce sont les lymphocytes Th1/17, particulièrement ceux exprimant l'intégrine  $\beta 7$ , qui migrent le plus efficacement. Ces données sont en accord avec la détection de LT CD4 exprimant des marqueurs d'adressage intestinal dans le SNC de patients notamment SEP et soutiennent un rôle pathogénique des LT CD4 dérivés de l'intestin dans la SEP. Nous nous sommes également intéressés à l'impact sur les LT CD4 int $\beta 7+$  du Natalizumab, traitement qui bloque la migration des lymphocytes dans le SNC en empêchant l'interaction entre l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  et VCAM-1. Nous avons observé une réduction de l'expression des molécules impliquées dans la migration à travers la BHE ainsi qu'une augmentation des propriétés inflammatoires des LT CD4 int $\beta 7+$  chez les patients sous Natalizumab suggérant que les LT CD4 int $\beta 7+$  pourraient être pathogéniques à l'arrêt du traitement.

En résumé, ces résultats apportent de nouvelles connaissances sur les LT CD4 intestinaux particulièrement les TFh chez les sujets sains et supportent un rôle pathogénique de ces cellules dans la SEP.

**Mots clés :** Lymphocytes T CD4 intestinaux, intégrine  $\beta 7$ , sclérose en plaques, TFh.

# Pathogenicity of gut-derived CD4 T cells in multiple sclerosis

## Abstract:

Multiple sclerosis (MS) is a chronic, autoimmune and inflammatory disease caused by the destruction of the myelin and the associated collateral tissues in the central nervous system (CNS). Currently, there is no effective treatment for the most disabling forms of MS (progressive forms). Studies in mouse models of MS as well as on patient samples have established that CD4 T cells are a central immune component in the pathogenesis of MS. Mouse studies have also shown that alterations in the composition of the intestinal microbiota largely modify the susceptibility to the disease by altering the properties of intestinal CD4 T cells but also those of CD4 T cells located in the CNS. Since studies in mouse models of several autoimmune diseases have shown that intestinal lymphocytes can migrate to the disease-target organs where they participate to the pathogenesis, we have focused on intestinal CD4 T cells and their possible pathogenicity in MS patients. As intestinal tissue samples from patients are ethically difficult to obtain, we studied the characteristics of intestinal lymphocytes from blood samples, by identifying them based on their expression of integrin  $\beta 7$ . First, we studied the phenotype and inflammatory properties of integrin-expressing  $\beta 7$  CD4 T cells ( $\beta 7^+$  CD4 T cells) in healthy subjects in order to characterize them. We observed that  $\beta 7^+$  CD4 T cells have a stronger inflammatory profile compared to  $\beta 7^-$  CD4 T cells. We were also able to demonstrate that follicular CD4 T cells (TFh) derived from the intestine ( $\beta 7^+$  TFh cells) induce a much lower secretion of type G and A immunoglobulins and a weaker differentiation of naive B cells into plasma cells compared to the TFh cells which are not derived from the gut. This difference of efficacy in helping B cells is not due to a difference in IL-21 secretion nor to a difference in the expression of ICOS, OX40, CD40-L and PD-1 molecules. In MS patients, we have observed that  $\beta 7^+$ TFh from SPMS (chronic phase) but not RRMS (inflammatory phase) patients have a capacity to help B cells comparable to those of  $\beta 7^-$  TFh cells from healthy donors. This result suggests that gut-derived TFh cells may be involved in the formation and/or maintenance of ectopic germinal centers, which are found in the meninges of more than 40% of SPMS patients and whose presence correlates with disease severity. Studies conducted *in vitro* and in mouse models of MS have shown that lymphocytes cross the blood-brain barrier (BBB) through the interaction of integrins  $\alpha 4\beta 1$  and  $\alpha L\beta 2$  with their respective ligands VCAM-1 and ICAM-1 expressed by the BBB endothelial cells. We observed that  $\beta 7^+$  CD4 T cells express  $\alpha L\beta 2$  integrin but also low levels of  $\alpha 4\beta 1$  integrin. We found that, *in vitro*,  $\beta 7^+$  CD4 T cells including TFh cells are able to migrate through a monolayer of BBB endothelial cells in an  $\alpha L\beta 2$ /ICAM-1 and  $\alpha 4\beta 1$ /VCAM-1 dependent manner. Among the CD4 T cell sub-populations, we determined that Th1/17 lymphocytes, particularly those expressing integrin  $\beta 7^+$ , migrate the most efficiently in our system. These data are consistent with the detection of CD4 T cells expressing gut-homing markers in the CNS of MS patients and support a pathogenic role of gut-derived CD4 T cells including TFh cells in MS.

We also investigated the impact of Natalizumab, a treatment used in the RRMS phase of MS which blocks the migration of immune cells into the CNS by preventing the interaction between integrin  $\alpha 4\beta 1$  and VCAM-1. We observed that  $\beta 7^+$  CD4 T cells from patients under Natalizumab display a reduction in the expression of the molecules involved in the transmigration across the BBB as well as an increase of their inflammatory profile suggesting that these cells could be pathogenic upon treatment arrest.

These results provide new insights into intestinal CD4 T cells, including TFh cells, in both healthy subjects and MS patients and support a pathogenic role of these cells, particularly TFh cells, in MS.

**Keywords:** Gut derived CD4 T cells, integrin  $\beta 7$ , Multiple sclerosis, TFh cells.

## Remerciements

Je remercie très sincèrement le Dr. Nicolas Fazilleau et le Dr. Gaëtan Jego d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse en tant que rapporteurs. Je remercie également le Pr. Frédéric Bérard, le Dr. Laure Michel ainsi que le Pr. Aurélie Ruet d'avoir accepté de faire partie de mon jury de thèse.

Je tiens également à remercier les patients du service de neurologie du CHU de Bordeaux, ainsi que l'ensemble du personnel du service pour m'avoir permis de travailler sur des prélèvements précieux, dont j'espère avoir fait bon usage durant ma thèse.

Je tiens à remercier la Fondation pour l'Aide à la Recherche sur la Sclérose en Plaques (ARSEP) qui nous a fait confiance en finançant une partie de mon projet. C'est grâce aux associations que la recherche peut perdurer plus sereinement.

\*\*\*\*\*

Je vais évidemment remercier tout particulièrement Nathalie Schmitt, ma directrice de thèse, qui a dû me supporter durant toutes ces années, même si la réciproque est vraie aussi. La thèse est une aventure en soi, et j'ai apprécié partager mes péripéties avec toi. Plus sérieusement, je te remercie pour ta rigueur scientifique, que j'apprécie à sa juste valeur, tout ce que tu m'as appris durant cette thèse, et aussi pour les valeurs humaines que tu défends.

Je remercie le Dr. Julie Déchanet-Merville et le Pr. Patrick Blanco de m'avoir accueillie au sein du laboratoire ImmunoConcEpT. Merci à l'ensemble des membres du laboratoire encore présents mais aussi à ceux qui sont partis, la recherche ne se mène pas seule, et chacun, à votre façon, participait à l'avancée du projet des autres. Je remercie particulièrement, Séverine, notre minouche officielle, pour tout ton soutien et ta bienveillance. L'aventure n'aurait pas été la même sans toi, très sincèrement merci d'être qui tu es. Je remercie Agnès et Anaëlle d'avoir participé à ce projet. Je remercie également, Dorothee, Mimi, Maria, pour toutes nos discussions sérieuses et moins sérieuses surtout. Merci aux personnels de plateforme Vincent et Atika pour leur aide au tri, et Xavier, qui m'a fait bien rire au quotidien.

A mes compagnons de thèse, de galères et de joies, que je compte désormais parmi mes amis. C'est difficile de résumer 4 années à vos côtés. Merci à Andréa, de m'avoir tellement soutenue et supportée, tu es vraiment la ziz, à Paô, notre imitatrice officielle qui va maintenant partager ce talent à NYC, à Nathalie, de me faire rire autant et d'être la première à me suivre dans mes délires, à Gabriel, pour ton côté « too much » et ton invitation à Andertoz que j'accepte avec plaisir, Corentin, alias Kokow ou el Cubeoww (TMTC), à Elena, alias Eleno qui a toujours su animer nos soirées sans le vouloir ! Enfin un

grand merci à toi, Adrien, on a tellement partagé de souvenirs, de discussions, de rigolades, tu es entré dans ma vie et j'espère que tu y resteras encore longtemps !

A mes BCPPiens, Stephnie (#minoritévisible), Greg, Solène, Éléonore (Léon), Thomas et Valentin, éparpillés aux quatre coins de la France, et qui commencent même à s'étaler à l'international. Il me tarde de voir notre prochaine destination pour nos weekends « à mi-chemin de tout le monde », que notre amitié perdure et traverse encore les années.

A mes amis et mes proches que je n'ai pas cité ici mais qui prennent une place importante dans ma vie, et qui resteront à mes côtés encore bien longtemps.

A ma famille, mes parents évidemment pour leur soutien et leur amour, à Jean-Paul, à ma sœur qui m'a toujours soutenue et qui a donné naissance à notre rayon de soleil, notre petite Angéline. Je remercie évidemment ma tante Josiane et Bruno, qui, malgré la distance, sont toujours dans mes pensées. Je vous remercie pour tout.

## Table des matières

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS</b> .....	<b>1</b>
<b>ABRÉVIATION</b> .....	<b>3</b>
<b>CHAPITRE 1 : GÉNÉRALITÉS SUR L'ORGANISATION DE LA RÉPONSE ADAPTATIVE : FOCUS SUR LES LYMPHOCYTES B ET LYMPHOCYTES T CD4</b> .....	<b>7</b>
<b>I. L'IMMUNITÉ ADAPTATIVE : LE DÉVELOPPEMENT D'UNE RÉPONSE ORGANISÉE</b> .....	<b>7</b>
A) Développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse .....	7
B) Développement des lymphocytes T dans le thymus .....	8
<b>II. IMMUNITÉ ADAPTATIVE : RÉPONSES EFFECTRICES</b> .....	<b>9</b>
A) Les organes lymphoïdes secondaires (SLO) : initiation de la réponse .....	9
B) Activation et différenciation des LB .....	10
a. La réponse des LB dépendante des LT .....	10
1- Caractéristiques des LB mémoires .....	11
2- Caractéristiques des plasmocytes .....	12
3- Fonction des LB : la sécrétion d'immunoglobulines par les plasmocytes .....	13
b. La réponse des LB indépendante des LT .....	15
C) Activation et différenciation des LT CD4 .....	15
<b>III. LA TOLÉRANCE CENTRALE ET PÉRIPHÉRIQUE</b> .....	<b>18</b>
<b>CHAPITRE 2 : RÔLE DES LYMPHOCYTES T FOLLICULAIRES AUXILIAIRES OU TFH (« T FOLLICULAR HELPER CELLS ») DANS LA RÉPONSE HUMORALE</b> .....	<b>20</b>
<b>I. DÉVELOPPEMENT ET IMPLICATION DES TFH DANS LA RÉACTION DU CENTRE GERMINATIF</b> .....	<b>20</b>
A) Découverte des lymphocytes T folliculaires (TFh) .....	20
B) La différenciation des TFh et la mise en place de la réponse des LB : processus en plusieurs étapes .....	22
a. Interaction avec les DC : mise en place d'un profil « pré-TFh » .....	23
1- Initiation du profil TFh par la signalisation du TCR et les molécules de costimulation .....	23
2- Initiation par les cytokines .....	24
b. Interaction avec les LB : acquisition du phénotype TFh mature .....	25
c. Interaction des TFh et des LB au niveau du GC : mise en place de la réponse humorale .....	27
C) Facteurs de transcription (FT) et molécules impliquées dans la différenciation et l'interaction entre les TFh et les LB .....	31
a. Facteurs de transcription .....	31
b. Molécules impliquées dans la différenciation des TFh et des LB .....	35
D) Régulation du GC : les LT folliculaires régulateurs .....	38
<b>II. LES TFH MÉMOIRES</b> .....	<b>39</b>
A) Découverte des TFh mémoires .....	39
B) Caractérisation des TFh mémoires .....	41
a. Caractérisation phénotypique .....	41
b. Caractérisation fonctionnelle .....	42
C) Les sous-types de TFh mémoires circulants .....	42
a. Les populations de cTFh1, cTFh2, cTFh17 et cTFh1/17 .....	42
b. Les TFh circulants (cTFr) .....	45
D) Plasticité entre les cTFh et les autres sous-types de LT effecteurs .....	45
<b>III. TFH DANS LES PATHOLOGIES : EXEMPLE DES MALADIES AUTO-IMMUNES (MAI)</b> .....	<b>47</b>
A) Ratio des sous-types de cTFh dans les MAI .....	48
B) Les structures lymphoïdes ectopiques (ELS) dans les MAI .....	48
C) Exemples du rôle des TFh dans les maladies auto-immunes .....	49
<b>CHAPITRE 3 : LA SCLÉROSE EN PLAQUES (SEP)</b> .....	<b>51</b>
<b>I. PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SEP</b> .....	<b>51</b>
A) Découverte de la SEP .....	51
B) La sclérose en plaques .....	52
C) Étiologie de la SEP .....	55
a. Hypothèse génétique .....	56
b. Hypothèse virale .....	56
c. Les facteurs environnementaux .....	57
d. Hypothèse immunitaire .....	58
<b>II. IMMUNOPATHOLOGIE DE LA SEP</b> .....	<b>59</b>
A) Modèle d'étude de la SEP : modèle EAE (expérimental auto-immune encephalitis) .....	59

B)	Immunopathologie de la SEP.....	61
a.	Migration des cellules du SI dans le SNC.....	61
b.	Phase inflammatoire.....	63
c.	Phase non inflammatoire.....	71
C)	Les TFh dans la SEP.....	73
<b>CHAPITRE 4 : LE CAS DES GALT DANS LA SEP.....</b>		<b>76</b>
<b>I. RELATION ENTRE LE MICROBIOTE INTESTINAL ET L'ORGANISME .....</b>		<b>76</b>
A)	Communication entre le microbiote et le SI au niveau des GALT.....	77
a.	Relation microbiote et cellules de l'immunité innée.....	79
b.	Relation microbiote et cellules de l'immunité adaptative.....	81
B)	Génération du « gut homing ».....	84
<b>II. LYMPHOCYTES INTESTINAUX : ACTEURS DES MAI ? .....</b>		<b>88</b>
<b>III. ÉVIDENCE DE L'IMPACT DU MICROBIOTE ET DES LT DERIVES DE L'INTESTIN DANS LA SEP.....</b>		<b>91</b>
<b>PROBLÉMATIQUE ET OBJECTIFS DE LA THÈSE.....</b>		<b>93</b>
<b>PROJET 1 : LE PROFIL TH17 DE TYPE TH1 INDUIT PAR LE NATALIZUMAB DANS LA SCLÉROSE EN PLAQUES EST RESTREINT AUX LT CD4 EXPRIMANT L'INTÉGRINE B7 .....</b>		<b>96</b>
<b>PROJET 2 : IMPLICATION DES TFH DÉRIVANT DE L'INTESTIN DANS LA PHYSIOPATHOLOGIE DE LA SEP .....</b>		<b>130</b>
MATERIEL ET METHODES .....		132
RESULTATS .....		142
<b>DISCUSSION .....</b>		<b>167</b>
<b>CONCLUSION GÉNÉRALE .....</b>		<b>177</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>		<b>178</b>



## Table des illustrations

<b>Figure 1</b> : Dynamique de la réaction du GC et sélection des LB de forte affinité pour l'antigène, d'après De Silva et Klein, 2015 <sup>16</sup> .....	11
<b>Figure 2</b> : Développement des SLPC et LLPC, inspiré de Liew 2012 <sup>24</sup> .....	13
<b>Figure 3</b> : Développement et différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs de différents types d'Ig, inspiré de Cambier et al, 2007 <sup>26</sup> .....	14
<b>Figure 4</b> : Régulation de la différenciation des sous-types de LT CD4 par les cytokines chez l'homme. ....	18
<b>Figure 5</b> : Localisation anatomique et interactions cellulaires nécessaires à la génération de TFh, de Ma et al., 2012 <sup>70</sup> .....	22
<b>Figure 6</b> : Interactions moléculaires entre les pré-TFh et les LB à la bordure LT:LB, adapté de Ma et al., 2012 <sup>70</sup> .....	27
<b>Figure 7</b> : Formation d'un centre germinatif dans le temps, de De Silva N., 2012 <sup>120</sup> .....	29
<b>Figure 8</b> : Mécanismes moléculaires induits par les GC TFh pour la différenciation des LB <sub>GC</sub> , de Crotty, 2011 <sup>131</sup> .....	31
<b>Figure 9</b> : Différentes capacités d'aide aux LB naïfs des sous-types de TFh mémoires inspiré de Morita et al. ....	44
<b>Figure 10</b> : Capacité d'aide aux LB de chaque sous type de cTFh mémoires d'après Schmitt et al, 2014. ....	44
<b>Figure 11</b> : Modèle inspiré de Fang et Zhu sur le développement des TFh sécréteurs de cytokines effectrices. ....	47
<b>Figure 12</b> : Schéma de Morita et al, 2011 <sup>209</sup> illustrant le ratio (cTFh1+cTFh2) /cTFh1 chez les donneurs sains et les patients atteints de MAI.....	48
<b>Figure 13</b> : Illustration des différentes phases de la SEP. ....	54
<b>Figure 14</b> : Tableau des traitements proposés dans la SEP en France. ....	55
<b>Figure 15</b> : Trafic des cellules du SI à travers les barrières du SNC d'après Charabi et al., 2020. ....	63
<b>Figure 16</b> : Implication des LT CD4 et LT CD8 dans le SNC, d'après Kaskow et Beacher-Allan, 2018. ....	68
<b>Figure 17</b> : Dérégulation du SI au niveau du SNC dans les phases précoces de la SEP (phases inflammatoires), d'après Dendrou et al., 2015.....	71
<b>Figure 18</b> : Schéma illustrant les follicules ectopiques, ou eGC, méningé chez les patients SPMS. ....	73
<b>Figure 19</b> : Les différentes voies de communication entre le microbiote intestinal et l'organisme. ....	77
<b>Figure 20</b> : Organisation de la barrière intestinale de l'intestin grêle et du gros intestin, d'après Brown et al., 2013 <sup>379</sup> .....	79
<b>Figure 21</b> : Le système immunitaire et le microbiote s'influencent mutuellement afin de conserver l'homéostasie au sein du tissu intestinal, inspiré de Kamada et al., 2013.....	84
<b>Figure 22</b> : Mécanismes d'induction des marqueurs intestinaux au niveau des GALT, inspiré par Coombes et Powrie, 2008 <sup>432</sup> .....	88
<b>Figure 23</b> : Le microbiote intestinal affecte les MAI extra-intestinales d'après Kamada et al., 2013..	90
<b>Figure 24</b> : Hypothèse de l'étude sur le potentiel rôle des TFh intestinaux dans la pathogenèse de la SEP, plus particulièrement en phase SPMS.....	94
<b>Figure 25</b> : Validation du modèle de transmigration avec les cellules endothéliales hCMEC/D3. ....	139
<b>Figure 26</b> : La proportion de TFh circulants est plus importante au sein des LT CD4 mémoires exprimant l'intégrine $\beta 7$ que dans le compartiment des LT CD4 mémoires n'exprimant pas l'intégrine $\beta 7$ .....	143
<b>Figure 27</b> : Les Th dérivant de l'intestin (intégrine $\beta 7+$ ) ont un profil plus inflammatoire comparés aux Th n'exprimant pas l'intégrine $\beta 7$ .....	145
<b>Figure 28</b> : Les TFh circulants dérivant de l'intestin présentent un profil plus activé comparés aux TFh circulant non intestinaux. ....	147
<b>Figure 29</b> : Les TFh circulants exprimant l'intégrine $\beta 7$ ont une faible capacité d'aide aux LB naïfs. ....	149
<b>Figure 30</b> : Les TFh circulants exprimant l'intégrine $\beta 7$ et CCR9 ont une plus faible capacité d'aide aux LB naïfs.....	151

<b>Figure 31</b> : Les cTFh2 et les cTFh17 exprimant l'intégrine $\beta 7$ ont une faible capacité d'aide aux LB naïfs. ....	152
<b>Figure 32</b> : La faible capacité d'aide aux LB des TFh int $\beta 7^+$ comparativement aux TFh int $\beta 7^-$ n'est pas due à une expression différentielle d'ICOS, CD40L, OX40 ou PD-1. ....	155
<b>Figure 33</b> : La faible capacité d'aide aux LB des TFh int $\beta 7^+$ comparativement aux TFh int $\beta 7^-$ n'est pas due à un défaut de sécrétion de l'IL-21. ....	156
<b>Figure 34</b> : Analyse des puces à ARN à l'échelle du génome des TFh int $\beta 7^-$ et int $\beta 7^+$ . ....	158
<b>Figure 35</b> : La migration des LT CD4 mémoires dérivant de l'intestin à travers la monocouche de cellules endothéliales de la BHE est médiée par l'intégrine $\beta 2$ et l'intégrine $\beta 1$ , in vitro. ....	160
<b>Figure 36</b> : Les sous-populations des Th et TFh exprimant l'intégrine $\beta 7$ sont capables de migrer à travers la monocouche de cellules endothéliales de la BHE in vitro. ....	162
<b>Figure 37</b> : La proportion de TFh circulants est orientée en faveur d'un phénotype capable d'aider les LB chez les patients en phase SPMS et PPMS. ....	163
<b>Figure 38</b> : La capacité d'aide aux LB naïfs des TFh intégrine $\beta 7^-$ et intégrine $\beta 7^+$ est supérieure chez les patients SPMS comparés aux patients en RRMS, en PPMS et aux donneurs sains, in vitro. ....	165
<b>Figure 39</b> : Données cliniques des patients SEP (ND, Non déterminé ; * patients utilisés pour les expériences de co-cultures allogéniques). ....	166
<b>Tableau 1</b> : Contribution des différentes cytokines à la CSR chez les LB humains, inspiré de Moens et Tangye 2014 <sup>128</sup> . ....	30
<b>Tableau 2</b> : Tableau récapitulatif des principaux modèles EAE <sup>282 285</sup> . ....	61

## Abréviation

<b>ADN</b>	Acide désoxyribonucléique
<b>AhR</b>	Aryl hydrocarbon receptor
<b>AID</b>	Activation induced deaminase
<b>AMPs</b>	Peptides antimicrobiens
<b>AP-1</b>	Activator protein 1
<b>APC</b>	Cellules présentatrices d'antigènes
<b>APRIL</b>	Proliferating-inducing ligand
<b>ARN</b>	Acide ribonucléique
<b>ASCL2</b>	Achaete scute homolog 2
<b>BAFF</b>	B-cell activating factor
<b>BALT</b>	Tissus lymphoïdes associés aux bronches
<b>Batf</b>	Basic leucine zipper transcription factor
<b>Bcl-6</b>	B cell lymphoma 6
<b>BCR</b>	B cell receptor
<b>bFGF</b>	Human Basic Fibroblast Growth Factor
<b>BHE</b>	Barrière hémato-encéphalique
<b>Blimp-1</b>	B lymphocyte-induced maturation protein-1
<b>c-Maf</b>	Musculoaponeurotic fibrosarcoma
<b>CAM</b>	Cell-adhesion molecule
<b>CD</b>	Maladie de Crohn
<b>DC</b>	Cellule dendritique
<b>CEI</b>	Cellules épithéliales intestinales
<b>CIS</b>	Syndromes cliniques isolés
<b>CLP</b>	Couches leuco-plaquettaires
<b>PLC</b>	Progéniteur lymphoïdes commun
<b>CMH</b>	Complexe majeur d'histocompatibilité
<b>CMP</b>	Progéniteur myéloïde-érythroïde commun
<b>CMV</b>	Cytomegalovirus
<b>CSH</b>	Cellules souches hématopoïétiques
<b>CSR</b>	Class switch recombinaison
<b>cTfr</b>	Tfr circulant
<b>CTLA-4</b>	Cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4
<b>CXCL</b>	CXC-chemokine ligand
<b>CXCR</b>	CXC-chemokine receptor
<b>DZ</b>	Zone sombre du centre germinatif
<b>EAE</b>	Experimental autoimmune encephalitis
<b>EBI2</b>	Epstein-Barr virus-induced G protein coupled receptor 2
<b>EBV</b>	Virus d'Epstein-Barr

<b>EDSS</b>	Expanded disability status scale
<b>ELS</b>	Structures lymphoïdes ectopiques
<b>ELS ou eGC</b>	Centre germinatif ectopique
<b>FDC</b>	Cellule dendritique folliculaire
<b>FOXO1</b>	Forkhead box O1
<b>FOXP1</b>	Foxhead box protein P1
<b>FOXP3</b>	Forkhead box P3
<b>GALT</b>	Tissus lymphoïdes associés à l'intestin
<b>GATA-3</b>	GATA-binding protein 3
<b>GC</b>	Centre germinatif
<b>GC TFh</b>	TFh du centre germinatif
<b>GF</b>	"Germ free"
<b>GITR</b>	Glucocorticoid-induced TNFR-related protein
<b>Glu-R3</b>	Récepteur au glutamate
<b>GPR15</b>	Orphan G-protein-coupled receptor 15
<b>GWAS</b>	Genome-wide association studies
<b>hCMEC/D3</b>	Human cerebral microvascular endothelial cell line
<b>HEV</b>	High endothelial venules
<b>HHV-6</b>	Herpesvirus humain de type 6
<b>IBD</b>	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
<b>ICAM-1</b>	Intercellular adhesion molecule 1
<b>ICOS</b>	Inducible T cell co-stimulator
<b>IFN</b>	Interferon
<b>Ig</b>	Immunoglobuline
<b>IL</b>	Interleukine
<b>ILC</b>	Innate lymphoid cells
<b>IRF4</b>	Interferon regulatory factor 4
<b>IRM</b>	Imagerie par résonance magnétique
<b>iTreg</b>	Induced regulatory T cells
<b>Klf2</b>	Kruppel-like factor 2
<b>LB</b>	Lymphocytes B
<b>LCMV</b>	Virus de la chorioméningite lymphocytaire
<b>LCR</b>	Liquide céphalo-rachidien
<b>LEF-1</b>	Lymphoid enhancer-binding factor 1
<b>LFA-1</b>	Lymphocyte function associated molecule 1
<b>LLPC</b>	Plasmocytes à longue durée de vie
<b>LN</b>	Ganglions lymphatiques
<b>LT CD4</b>	Lymphocyte T CD4
<b>LTa</b>	Lymphotoxine a
<b>LZ</b>	Zone claire du centre germinatif
<b>MadCAM-1</b>	Mucosal addressin cell adhesion molecule 1

<b>MAI</b>	Maladies auto-immunes
<b>MALT</b>	Tissus lymphoïdes associés aux muqueuses
<b>MAPK</b>	Mitogen-associated protein kinase
<b>MBP</b>	Myelin basic protein
<b>mLN</b>	Ganglions lymphatiques mésentériques
<b>MO</b>	Moelle osseuse
<b>MOG</b>	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
<b>NALT</b>	Tissus lymphoïdes associés à la cavité nasale
<b>NFAT</b>	Nuclear factor of activated T cell protein
<b>nTreg</b>	Natural regulator T cells
<b>NTZ</b>	Natalizumab
<b>PAMP</b>	Pathogen-associated molecular patterns
<b>PAR</b>	Polyarthrite rhumatoïde
<b>PBMC</b>	Peripheral blood mononuclear cell
<b>PC</b>	Plasmocytes sécréteurs d'anticorps
<b>PECAM-1</b>	Platelet endothelial cell adhesion molecule 1
<b>PLO</b>	Organes lymphoïdes primaires
<b>PLP</b>	Protéines protéolipide
<b>PMA</b>	Phorbol myristate acétate
<b>PP</b>	Plaques de Peyer
<b>PPMS</b>	Sclérose en plaques progressive primaire
<b>PRR</b>	Pattern recognition receptors
<b>PSA</b>	Polysaccharide A
<b>PSGL-1</b>	P-selectin ligand-1
<b>RA</b>	Acide rétinoïque
<b>RALDH2</b>	Retinal deshydrogenase 2
<b>RCH</b>	Rectocolite hémorragique
<b>RegIIIg</b>	Regenerating islet-derived protein 3
<b>RORgt</b>	Retinoic acid related orphan nuclear receptor gamma
<b>RRMS</b>	Sclérose en plaques récurrente-rémittente
<b>S1PR2</b>	S1P receptor 2
<b>SAA</b>	Serum amyloid A protein
<b>SALT</b>	Tissus lymphoïdes associés à la peau
<b>SAP</b>	SLAM-associated protein
<b>SB</b>	Substance blanche
<b>SCFA</b>	Acide gras à chaîne courte
<b>SEB</b>	Entérotoxine B staphylococcique
<b>SEP</b>	Sclérose en plaques
<b>SFB</b>	<i>Segmented filamentous bacteria</i>
<b>SG</b>	Substance grise
<b>SGS</b>	Syndrome de Gougerot-Sjögren

<b>SHM</b>	Hypermutation somatique
<b>SHP-1</b>	Src Homology 2 domain-containing Phosphatase 1
<b>sIgA</b>	IgA sécrétés
<b>SLAM</b>	Signaling lymphocyte activation molecular associated protein
<b>SLE</b>	Lupus érythémateux systémique
<b>SLO</b>	Organes lymphoïdes secondaires
<b>SLPC</b>	Plasmocytes à courte durée de vie
<b>SNC</b>	Système nerveux central
<b>SPMS</b>	Sclérose en plaques secondairement progressive
<b>T-bet</b>	T-box transcription factor
<b>TCF-1</b>	T cell factor 1
<b>TCR</b>	T cell receptor
<b>TFh</b>	Lymphocyte T folliculaire auxiliaire
<b>TFr</b>	TFh régulateur
<b>Th</b>	Lymphocyte T auxiliaire ou T helper cell
<b>TLR</b>	Toll-like receptor
<b>Tph</b>	Pathogenic T peripheral helper cells
<b>TT</b>	Toxine du tétanos
<b>UC</b>	Colite ulcéreuse
<b>VCAM-1</b>	Vascular cell adhesion molecule 1
<b>VLA-4</b>	Very late antigen 4

## Chapitre 1 : Généralités sur l'organisation de la réponse adaptative : focus sur les lymphocytes B et lymphocytes T CD4

La réponse du système immunitaire aux pathogènes est, classiquement, divisée en deux : la réponse dite innée et la réponse dite adaptative. Contrairement à l'immunité innée qui se met en place directement après l'entrée d'un pathogène dans l'organisme, il faut plusieurs jours au système immunitaire pour développer une réponse immunitaire adaptative. L'immunité innée permet de répondre rapidement et de manière peu spécifique à un agent infectieux donné. A l'inverse, l'immunité adaptative permet une réponse immunitaire spécifique à un pathogène, et le développement d'une mémoire immunitaire permettant une élimination plus efficace de celui-ci lors d'une seconde rencontre.

### I. L'immunité adaptative : le développement d'une réponse organisée

Chez l'homme, le tissu lymphoïde regroupe l'ensemble des organes où résident les lymphocytes ainsi que d'autres cellules immunitaires. On différencie deux types d'organes lymphoïdes, i) les organes lymphoïdes primaires (PLO), lieu de développement des cellules immunitaires, comprenant la moelle osseuse (MO) et le thymus, et ii) les organes lymphoïdes secondaires (SLO), lieu d'activation et de différenciation. Dans cette partie, nous allons nous intéresser au développement des **lymphocytes B (LB)** et **lymphocytes T CD4 (LT CD4)**.

La MO est le lieu de l'hématopoïèse, signifiant « fabriquer du sang » en grec, qui se déroulera tout le long de la vie de l'individu. Ce processus désigne l'ensemble des mécanismes aboutissant à la formation, de façon continue et régulée, des éléments figurés du sang à partir de cellules souches hématopoïétiques (CSH). De nombreuses étapes sont nécessaires, notamment la division asymétrique d'une CSH en cellule souche et en progéniteur myéloïde-érythroïde commun (CMP) ou progéniteur lymphoïde commun (PLC). La différenciation d'un CMP va donner la lignée érythroïde ainsi que les monocytes, granulocytes, macrophages et les mégacaryocytes. Le PLC va, quant à lui, être à l'origine des LB, LT et des cellules « natural killer » (cellules NK). Les progéniteurs des LB vont poursuivre leur différenciation dans la MO, tandis que les progéniteurs des LT vont terminer leur développement dans le thymus.

#### A) Développement des lymphocytes B dans la moelle osseuse

De nombreux signaux vont être nécessaires à la différenciation des progéniteurs des LB jusqu'à l'obtention de LB naïfs matures ayant un répertoire de BCR (B cell receptor), récepteurs des LB, capables de reconnaître un large spectre d'antigènes. Le BCR est un récepteur formé d'une

immunoglobuline (Ig), aussi appelé anticorps, et du CD79 (module de transduction du signal). La spécificité antigénique se trouve au niveau de la région variable des chaînes lourdes (CH) et légères (VH) des deux fragments Fab (fragment antigen binding). Le processus de maturation aboutissant à sa formation est indépendant de la présentation antigénique et contrôlé par les cytokines environnantes<sup>1</sup>. La formation du BCR est un processus nécessitant le réarrangement des chaînes lourdes et légères des Ig. Le réarrangement des gènes de l'Ig se réalise de manière ordonnée de façon à ce que chaque LB n'exprime qu'un allèle de chaîne lourde et de chaîne légère. La formation progressive du BCR va conduire les LB à être sélectionnés positivement, par des signaux de survie, permettant de contrôler le développement d'une paire de chaînes H et L fonctionnelles et d'éviter les combinaisons de chaînes H-L autoréactives. L'ensemble de ce processus aboutit à la génération de LB possédant une grande diversité de BCR, capables de reconnaître un grand nombre d'antigènes<sup>2</sup>.

La cellule va devoir passer par plusieurs étapes afin d'y parvenir : d'une cellule pré-pro B (CD19<sup>-</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>), suivi du stade de cellule pro-B (CD19<sup>+</sup> CD27<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>IgD<sup>-</sup>), puis de cellule pré-B (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup> IgD<sup>-</sup>IgM<sup>-</sup>) à un LB immature (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>)<sup>3</sup>, pour finir à un LB naïf mature (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>-</sup>IgM<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup>)<sup>4</sup>. Le LB naïf exprime à sa surface l'IgM et l'IgD qui possèdent la même spécificité antigénique car ils possèdent le même réarrangement des gènes des chaînes H et L, contenant les mêmes exons VHDHJH et VLJL<sup>5 6</sup>. Les LB naïfs matures, dans leur stade de développement, vont ensuite migrer en direction des SLO via la circulation sanguine.

## **B) Développement des lymphocytes T dans le thymus**

Les LT immatures vont migrer dans le thymus, via la circulation sanguine, pour pouvoir terminer leur maturation. Une fois arrivés dans le thymus, les LT immatures, aussi appelées thymocytes, vont devoir passer plusieurs étapes afin d'aboutir à l'obtention d'une population de LT CD4, marqueur des lymphocytes T auxiliaires (Th) ou CD8, marqueur des LT cytotoxiques. Les thymocytes provenant de la MO sont dits doubles négatifs (DN) du fait de l'absence d'expression des corécepteurs CD4 ou CD8. Les cellules passent par plusieurs étapes de DN - DN1 (CD117<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>), DN2 (CD117<sup>+</sup>CD44<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>), DN3 (CD117<sup>low</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>+</sup>) et DN4 (CD117<sup>-</sup>CD44<sup>-</sup>CD25<sup>-</sup>) - avant d'arriver au stade de cellule double positive (DP) puis de cellule simple positive CD4 ou CD8 (SP)<sup>7</sup>.

Tout comme les LB, les LT vont devoir former leur « T cell receptor » ou TCR, responsable par la suite de leur interaction avec les molécules du CMH (complexe majeur d'histocompatibilité). Le réarrangement des gènes des chaînes  $\alpha$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\beta$  du TCR débute au stade DN2 et se poursuit jusqu'au DN4. Selon l'arrangement des gènes, les LT en cours de maturation vont posséder un TCR $\gamma\delta$  ou un TCR $\alpha\beta$ . Les LT vont exprimer à leur surface une première version de la chaîne  $\alpha$  (VJ) du TCR appelé



la chaîne pré-T $\alpha$ , avant de s'engager dans une lignée TCR $\alpha\beta$ , avec une chaîne  $\beta$  du TCR fonctionnelle, donnant les LT CD4 ou CD8<sup>8</sup>. Débute ensuite un réarrangement des gènes de la chaîne  $\alpha$  du TCR qui va s'associer à la chaîne  $\beta$  (VDJ) ainsi qu'aux protéines du complexe CD3 pour former le pré-TCR. Une association correcte de l'ensemble de ces partenaires va induire la prolifération des cellules, un arrêt du réarrangement des gènes de la chaîne  $\beta$  et l'induction de l'expression des corécepteurs CD4 et CD8 (stade DP). Les LT qui expriment un complexe TCR $\alpha\beta$ /CD3 mature vont ensuite subir une succession de sélection dans l'environnement thymique : la sélection positive (restriction au CMH) et négative (tolérance du soi). Les réarrangements aléatoires des chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  au cours de la maturation thymique, associés aux nombreuses possibilités d'appariements entre les chaînes  $\alpha$  et  $\beta$  aboutissent à une grande variabilité du TCR. Ceci permet aux LT d'avoir un large spectre de spécificité antigénique permettant reconnaître un grand nombre de pathogènes.

Les LT DP vont ensuite s'engager vers une lignée de LT CD4 ou LT CD8 en fonction du corécepteur exprimé à leur surface. Le choix de l'orientation vers la lignée LT CD4 ou LT CD8 n'est pas encore totalement compris. Des études ont proposé que la sélection d'un corécepteur dépende de la force et/ou de la longueur de l'interaction corécepteur/TCR/CMH-peptide ainsi que de l'activation de gènes spécifiques de la lignée LT CD8 ou LT CD4<sup>9</sup>. D'autres modèles ont également proposé que l'interaction TCR/CMHI ou TCR/CMHII conduit l'engagement vers une lignée spécifique, mais ce processus nécessite davantage d'investigations.

Après sélection et différenciation des LT CD4 ou CD8, ces derniers sont désormais aptes à quitter le thymus en direction des SLO, lieu d'activation des LT.

## **II. Immunité adaptative : réponses effectrices**

### **A) Les organes lymphoïdes secondaires (SLO) : initiation de la réponse**

Les cellules présentatrices d'antigènes (APC) tels que les cellules dendritiques (DC) vont migrer au niveau des SLO pour venir y présenter l'antigène aux cellules immunitaires. La rencontre et la reconnaissance de l'antigène présenté va activer les lymphocytes et aboutir à leur différenciation en lymphocytes effecteurs ou mémoires.

Parmi les SLO, on distingue des organes bien structurés, spécifiquement dédiés à la réponse immunitaire, tels que les ganglions lymphatiques (LN) et la rate, ainsi que des tissus lymphoïdes associés aux muqueuses (MALT)<sup>10</sup>. Les MALT sont situés à des endroits stratégiques d'entrée des pathogènes et représentent environ 80% de la masse du tissu lymphoïde de l'organisme. Ils regroupent, entre autres, les tissus lymphoïdes associés à l'intestin (GALT) incluant les plaques de Peyer (PP), les amygdales,

les tissus lymphoïdes associés aux bronches (BALT), les tissus lymphoïdes associés à la cavité nasale (NALT) et ceux associés à la peau (SALT). D'autres petites structures lymphoïdes peuvent apparaître de manière spontanée, correspondant aux follicules lymphoïdes isolés (ILF), souvent retrouvés dans les tissus bronchiques et intestinaux<sup>11 12</sup>. Les GALT constituent la plus grande partie des MALT, quantitativement, et représentent donc un lieu privilégié pour le développement de la mémoire immunitaire.

## **B) Activation et différenciation des LB**

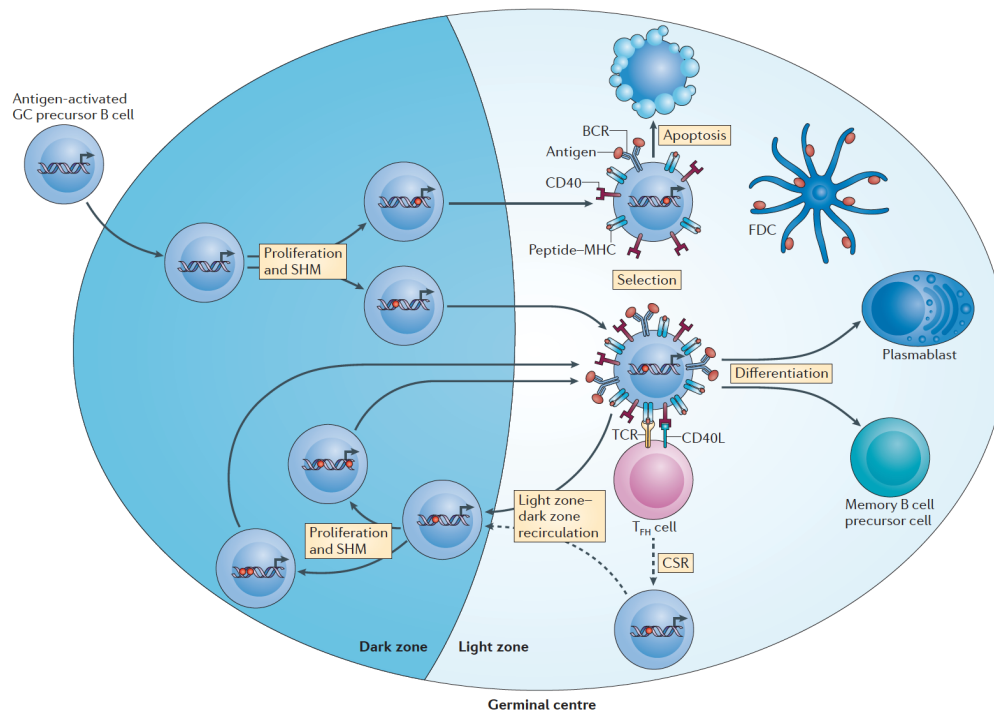
Il existe deux voies pour l'activation et la différenciation d'un LB naïf : la réponse des LB dépendante de l'interaction avec les LT se déroulant au sein des follicules des SLO, et la réponse des LB indépendante des LT qui a lieu dans les zones extrafolliculaires des SLO<sup>13</sup>.

### **a. La réponse des LB dépendante des LT**

L'activation des LB naïfs et leur différenciation en LB mémoires ou plasmocytes sécréteurs d'anticorps (PC) va dépendre de nombreuses interactions cellulaires qui se produisent au sein des SLO. Une fois que les LB naïfs sont activés par la reconnaissance de l'antigène présenté, sous forme de complexe immun par les DC folliculaires (FDC) ou par les macrophages, ils vont rapidement entrer dans une expansion clonale dans le follicule. Quelques jours après le contact des LB avec l'antigène, le follicule secondaire va se polariser en deux zones, la zone sombre (DZ) et la zone claire (LZ), et former ainsi le centre germinatif (GC). Les LB activés se trouvent, en premier lieu, dans la DZ où ils vont continuer à proliférer et devenir des centroblastes. Ces derniers vont subir une diversification du répertoire de leur BCR par hypermutation somatique (SHM), puis vont migrer au niveau de la LZ pour devenir des centrocytes<sup>14</sup> (**Figure 1**). Les étapes d'activation, de prolifération et de sélection sont dépendantes de l'interaction des LB avec les LT CD4 présents au niveau de la LZ du GC. Les LT CD4 impliqués dans ce processus sont les LT folliculaire auxiliaires (TFh) que nous verrons en détails dans le chapitre suivant.

L'SHM est un processus par lequel des mutations aléatoires et ponctuelles sont générées au niveau des exons VDJ (régions variables des chaînes lourdes et légères) du BCR des centroblastes lors de la réplication de leur ADN. L'enzyme AID (activation induced deaminase) va être responsable de l'initiation de la diversité des mutations en remplaçant une cytosine par un uracile<sup>15</sup>. L'accumulation des mutations au niveau du site de liaison à l'antigène va permettre aléatoirement d'augmenter l'affinité du BCR pour celui-ci. Au niveau de la LZ, les centrocytes vont être sélectionnées positivement ou négativement en fonction de l'affinité de leur BCR pour l'antigène présenté. En parallèle, les centrocytes sélectionnés peuvent subir une commutation de classe (CSR pour « class switch recombinaison ») qui

correspond au changement de classe, d'isotype des Ig produites par le LB <sup>15</sup>. Ce processus permet aux LB de remplacer la production initiale d'IgM par l'IgG, l'IgA ou l'IgE possédant la même spécificité antigénique afin de diversifier la réponse des LB. Les LB vont migrer de la DZ à la LZ et inversement afin de réaliser plusieurs cycles de prolifération, diversification de leur BCR et sélection aboutissant à une différenciation terminale en plasmocytes de longue durée sécrétant Ig ou en LB mémoires (**Figure 1**).



**Figure 1: Dynamique de la réaction du GC et sélection des LB de forte affinité pour l'antigène, d'après De Silva et Klein, 2015<sup>16</sup>.**

Les LB activés par leur rencontre avec l'antigène vont former le GC, dans lequel ils vont subir une expansion clonale aboutissant à la formation d'un GC mature, caractérisé par la présence d'une DZ et LZ. Au niveau de la DZ, les LB subissent le processus de SHM permettant le réarrangement des chaînes de la région variable du BCR. Les LB de la DZ ou centroblastes vont ensuite se diriger dans la LZ où ils vont interagir avec les TFh et les FDC et être ainsi sélectionnés en fonction de leur affinité pour l'antigène présenté. En effet, les LB ayant subi une SHM ont un BCR plus affiné, avec une capacité plus grande de capture de l'antigène et de présentation aux TFh. Une fois sélectionnée positivement, les LB de la LZ ou centrocytes, peuvent subir un CSR, avant de recirculer dans la DZ où ils vont refaire un cycle de prolifération et d'hypermutation aboutissant à la genèse de LB de plus en plus affins.

### 1- Caractéristiques des LB mémoires

Les LB mémoires ( $CD27^+IgM^{+/-}IgD^+$ ) générés dans le GC ont une durée de vie très longue (plusieurs années) et ont une forte affinité pour l'antigène. Ils vont être réactivés lors d'une seconde rencontre avec le pathogène pour lequel ils sont spécifiques, se différencier en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, permettant ainsi la mise en place d'une réponse immunitaire plus rapide. Ils ont également

la possibilité d'entrer dans un nouveau cycle du GC afin d'augmenter davantage leur affinité pour l'antigène.

## 2- Caractéristiques des plasmocytes

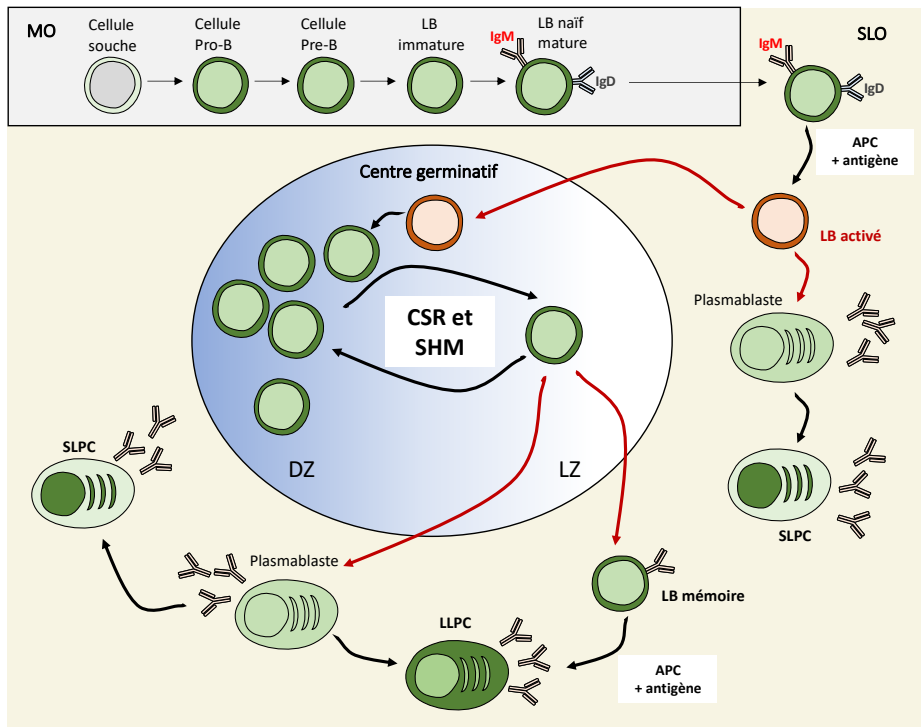
### Plasmocytes à courte durée de vie (SLPC)

Dans certains cas, une minorité de LB présents dans le follicule primaire et dans un état activé ne va pas participer à la réaction du GC. En effet, ces cellules vont réguler négativement le facteur de transcription Bcl-6 (B cell lymphoma 6) ce qui va directement les diriger vers une différenciation en plasmocyte, sans avoir subi de SHM ni de CSR<sup>17</sup>. Leur durée de vie est estimée à quelques jours et ils ne sécrètent que des IgM, car leur production ne dépend pas de la CSR. Les SLPC peuvent également être générés rapidement après la réaction du GC, impliquant le processus de SHM et éventuellement CSR, et vont être les premiers à participer à la réponse humorale (**Figure 2**).

### Plasmocytes à longue durée de vie (LLPC)

Suite à plusieurs cycles d'SHM et de CSR, les centrocytes qui régulent à la baisse l'expression de Bcl-6 et à la hausse celle du facteur de transcription Blimp-1 (B lymphocyte-induced maturation protein-1), vont préférentiellement se différencier en plasmablastes puis en plasmocytes (PC) sécréteurs d'anticorps à durée de vie longue (plusieurs mois)<sup>18</sup>. Chez l'homme, les LLPC sont identifiés par leur forte expression de CD27, CD38 et CD138<sup>19 20</sup>. Les PC sont caractérisés par leur expression du CD138, accompagnée par une augmentation du niveau d'expression du CD38 (CD138+CD38+), reflétant un stade de maturation supérieure aux plasmablastes (CD38+CD138-)<sup>21 22</sup>. Ce stade terminal de différenciation est accompagné par une diminution de l'expression des molécules telles que le CD20, CD40, le CMHII, le CXCR5 et le CXCR4<sup>22 23 20</sup>. Toutefois, la diminution de CXCR4 est observée chez la souris mais son expression est maintenue chez l'Homme. Les LLPC ne peuvent donc plus être réactivés par des LT CD4 et perdent également leur capacité à proliférer.

Après leur formation, les plasmocytes vont circuler dans le sang et s'établir dans des niches au niveau de la MO, de la pulpe rouge de la rate ainsi que dans les LN qui vont i) fournir les signaux de survie nécessaires comme l'IL-6 (Interleukine-6), le CXCL12, APRIL et BAFF et ii) permettre la circulation des anticorps via leur riches réseaux vasculaires<sup>19</sup>.

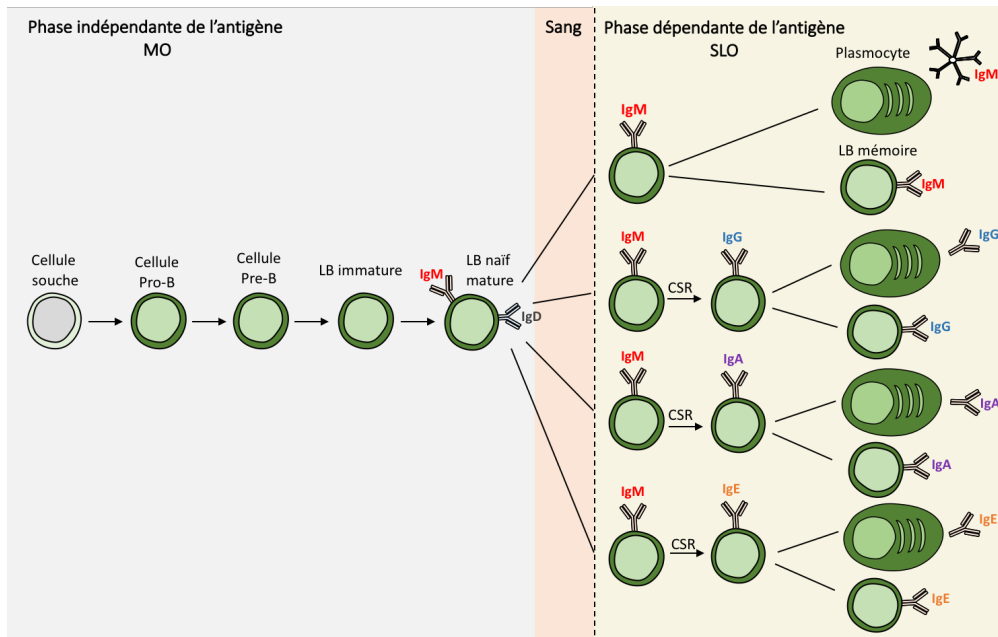


**Figure 2: Développement des SLPC et LLPC, inspiré de Liew 2012<sup>24</sup>.**

Dans les SLO, les LB naïfs peuvent rencontrer un antigène permettant leur activation et différenciation en plasmocyte à durée de vie courte (SLPC). Les SLPC vont constituer la première ligne de défense contre le pathogène. Les LB naïfs activés peuvent également entrer dans la réaction du GC afin d’y réaliser plusieurs cycles de prolifération, l’hypermutation somatique (SHM), et la commutation de classe (CSR) aboutissant à la génération de LB mémoires et de plasmablastes. Les plasmablastes peuvent donner des SLPC ou des plasmocytes à durée de vie longue (LLPC). Les LB mémoires peuvent, lors d’une seconde rencontre avec l’antigène pour lequel ils sont spécifiques, se différencier en LLPC.

### 3- Fonction des LB : la sécrétion d’immunoglobulines par les plasmocytes

Les Ig ou anticorps sécrétés par les plasmocytes ont un rôle central dans la réponse immunitaire. Leur fixation directement sur le pathogène peut inhiber son interaction avec son hôte, activer la cascade du complément, participer à la destruction du pathogène via la reconnaissance du fragment constant (Fc) des Ig par les autres acteurs du SI<sup>25</sup>. Il existe 4 isotypes d’Ig sécrétés par les LB, qui vont avoir des fonctions distinctes en partie dû à la différence de composition de leur séquence d’acide aminés en position C-terminale : **IgM**, **IgG**, **IgA** et **IgE**. Chaque isotype va être généré en fonction de l’activation des LB et des cytokines environnantes (**Figure 3**).



**Figure 3 : Développement et différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs de différents types d'Ig, inspiré de Cambier et al, 2007<sup>26</sup>.**

Le développement des LB commence dans la MO, à partir d'une cellule souche jusqu'au stade du LB naïf mature (IgD+IgM+). Les LB naïfs vont ensuite passer dans la circulation sanguine et migrer dans les SLO où va se dérouler leur maturation, suite à la présentation de complexe immun par les FDC. La différenciation des LB aboutit à la genèse de plasmocytes et de LB mémoires. Le processus de CSR va permettre la commutation de classe des Ig, qui vont avoir chacune leur spécificité.

Les IgM sont de faible affinité pour l'antigène et se distinguent par, leur polyréactivité liée à leur structure assurant la protection contre une infection bactérienne, virale et parasitaire ; ainsi que par leur capacité à faciliter l'élimination des cellules apoptotiques<sup>27</sup>. Les IgM sont les premières Ig à être sécrétées suite à une primo-infection.

La distribution et la quantité dans l'organisme est propre à chaque isotype. Chez l'homme, l'IgG représente l'isotype le plus abondant dans la circulation sanguine, et est divisée en sous-classes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Chaque sous-classe d'IgG va avoir des propriétés biologiques et des capacités effectrices différentes. Par exemple, il a été montré que les IgG2 et IgG4 vont particulièrement interagir avec des antigènes polysaccharidiques, tandis que les IgG1 et IgG3 sont induits en réponse à un antigène de type protéique<sup>28</sup>.

Concernant les IgA, ils sont divisés en deux sous-classes : IgA1 et IgA2. Le niveau d'IgA est classiquement inférieur à celui des IgG dans le sérum mais est prédominant au niveau des GALT. Ils vont avoir un rôle essentiel dans la neutralisation directe des toxines, virus et bactéries au niveau du tissu intestinal.

Les IgE sont associées à la réponse contre les helminthes, l'hypersensitivité ainsi que les réactions allergiques. De manière générale, les IgE sont présentes en faible concentration dans le sérum<sup>29 28</sup>.

### **b. La réponse des LB indépendante des LT**

La réponse des LB indépendante des LT est rendue possible grâce à la nature de l'antigène présent dans l'environnement. En effet, certains antigènes tels que les polysaccharides bactériens sont capables d'activer directement les LB, sans intervention des LT, et d'induire leur différenciation<sup>30 31</sup>. Des études ont mis en évidence l'implication des DC et macrophages dans le maintien de ce pool de LB activés (signaux de survie et prolifération), soutenant ainsi leur différenciation en plasmocytes sécrétant d'IgM ou IgG de faible affinité<sup>32</sup>.

### **C) Activation et différenciation des LT CD4**

Les LT CD4 jouent un rôle crucial dans l'orchestration de la réponse immunitaire notamment à travers l'aide aux LB, le soutien à la réponse des LT CD8, des macrophages etc. Une fois sortie du thymus, les LT CD4 naïfs vont circuler en direction des SLO. La différenciation des LT CD4 naïfs débute par l'interaction du TCR et du corécepteur CD4 avec le complexe CMHII-peptide présenté par une APC<sup>33</sup>. L'activation du TCR va permettre l'induction de voie de signalisation qui va diriger la différenciation du LT CD4 naïf en un LT effecteur, aussi appelé Th (T helper cell). En fonction des cytokines présentes dans le milieu, du type et de la concentration de l'antigène ainsi que de l'activation des molécules de costimulation (notamment les molécules membres de la famille B7 ou de la super famille TNF), les LT CD4 vont se différencier en différents sous-types de Th effecteurs : les Th1, Th2, Th17, Th9, Th22, iTreg et TFh (**Figure 4**). Ils sont caractérisés par i) leur profil cytokinique, ii) l'expression de facteur de transcription canonique qui permet de les identifier et qui participe à leur différenciation iii) leur fonction.

Nous allons voir brièvement l'ensemble de ces populations qui vont avoir un rôle physiologique de défense de l'organisme mais peuvent également être impliqués dans le développement de pathologies.

#### **Les Th1 (« T helper 1 »)**

Les Th1 sont impliqués dans l'élimination des pathogènes intracellulaires, l'activation de nombreuses cellules immunitaires dont les macrophages et les LT CD8. Ils sont définis par leur sécrétion d'IFN $\gamma$  (Interferon  $\gamma$ ) et de lymphotoxine  $\alpha$  (L $\alpha$ ). L'orientation d'un LT CD4 naïf en faveur d'un phénotype Th1 va faire intervenir la sécrétion d'IL-12 par les DC notamment<sup>34</sup>. Le facteur de

transcription qui va promouvoir la différenciation en Th1 est T-bet (T-box transcription factor). Ce dernier va à la fois induire l'expression des gènes nécessaires au phénotype Th1 mais également l'inhibition des gènes impliqués dans la différenciation en d'autres sous-types de LT effecteurs<sup>33</sup>. Les Th1 sont souvent associés au développement de maladies auto-immunes de par leur profil inflammatoire.

### Les Th2 (« T helper 2 »)

Les Th2 vont intervenir dans l'élimination d'infection parasitaire extracellulaire dont les helminthes. Ils sécrètent l'IL-4, IL-5, IL-13 et vont être impliqués dans les réponses allergiques<sup>35</sup>. En effet, l'IL-4 et IL-13 vont être importantes dans l'activation des LB, l'induction de la commutation de classe en IgE par les LB. L'IL-5 va elle agir au niveau du développement et de l'activation des éosinophiles. La sécrétion d'IL-4 par les DC est nécessaire à la différenciation des LT CD4 naïfs en Th2, en induisant notamment l'expression du facteur de transcription spécifique à ce lignage, GATA-3 (GATA-binding protein 3)<sup>36 37</sup>.

### Les Th17 (« T helper 17 »)

Les Th17 sont spécialisés dans la réponse contre les bactéries extracellulaires et les infections fongiques. Les cytokines associées aux Th17 sont : l'IL-17A, l'IL-17F, l'IL-22, IL-6 et l'IL-21<sup>33</sup>. L'IL-17 va induire la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, le IL-1 $\beta$ , le GM-CSF, le TNF $\alpha$  par les cellules de l'immunité innée ainsi que la production de chimiokines assurant l'attraction des cellules immunitaires au site de l'inflammation<sup>33</sup>. L'IL-22 va participer à la défense de l'hôte contre les bactéries en promouvant notamment la sécrétion de peptides antimicrobiens<sup>38</sup>. L'IL-21 a de multiples fonctions dont l'activation des LB, des LT et des cellules NK<sup>39 40</sup>. Les Th17 sont souvent associés au développement de maladies auto-immunes du fait de leur profil inflammatoire.

Chez l'homme, l'IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-23 et le TGF- $\beta$  sont les cytokines majeures impliquées dans l'induction de la différenciation des LT CD4 naïfs en Th17<sup>41 42</sup>. Le facteur de transcription canonique des Th17 est ROR $\gamma$ t (retinoic acid related orphan nuclear receptor gamma) qui va être impliqué dans la mise en place du profil Th17<sup>43 44 33</sup>.

### Les Th9 (« T helper 9 »)

Les Th9 sont caractérisés par leur sécrétion importante d'IL-9, participant ainsi à l'inflammation dans des contextes d'allergies ou de cancer. L'IL-9 va participer, entre autres, au recrutement des



mastocytes et à leur prolifération. Les cytokines qui vont induire la différenciation en Th9 sont l'IL-4 en combinaison avec le TGF- $\beta$ <sup>45</sup>. La différenciation des Th9 est proche de celle des Th2 puisqu'ils expriment également GATA-3, mais l'expression supplémentaire du facteur de transcription PU.1 dans les Th9 est spécifique à cette population.

### Les Th22 (« T helper 22 »)

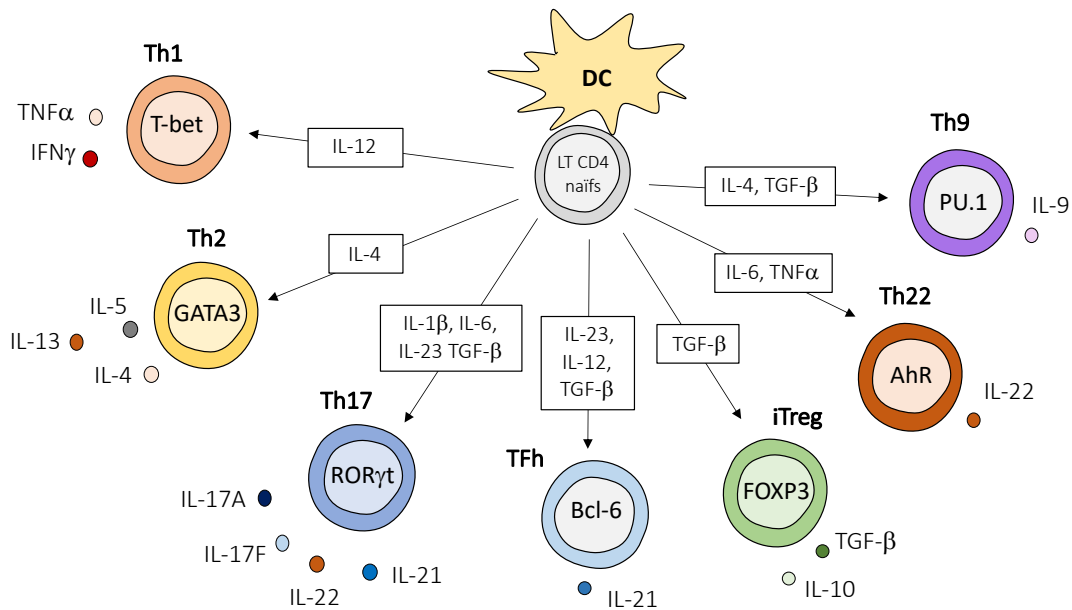
Tout comme les Th9, les Th22 ont été nommés ainsi de par leur forte production d'IL-22. La sécrétion de cette cytokine n'est pas restreinte à cette population mais dans le cas des Th22 celle-ci n'est pas accompagnée de la sécrétion d'IL-17 comme pour les Th17<sup>46</sup>. Les Th22 sont impliqués dans de nombreux mécanismes tels que la régulation des cellules immunitaires innées ou la stimulation du remodelage tissulaire. La différenciation en Th22 est conduite par l'IL-6 et le TNF $\alpha$  et dépend de l'expression du facteur de transcription AhR (aryl hydrocarbon receptor).

### Les iTreg (« induced regulatory T cells»)

Contrairement aux nTreg (natural regulator T cells) qui dérivent d'une population de cellules thymiques, les iTreg sont induits à partir d'un LT CD4 naïf. Les iTreg vont contrôler la réponse immunitaire par la sécrétion d'IL-10, de TGF- $\beta$  et d'IL-35 qui vont inhiber l'inflammation en agissant directement sur les APC ou les LT<sup>47 48</sup>. Le TGF- $\beta$  et l'IL-2 vont être impliqués dans la génération en iTreg en participant notamment à l'expression du facteur de transcription FOXP3 (Forkhead box P3).

### Les TFh (« T follicular helper »)

Les TFh représentent la population de LT CD4 spécialisés dans l'aide aux LB. Mes travaux de recherche se sont particulièrement concentrés sur l'étude des TFh, que nous verrons en détails dans le chapitre suivant.



**Figure 4: Régulation de la différenciation des sous-types de LT CD4 par les cytokines chez l'homme.**

Le LT CD4 naïf est activé par la reconnaissance de l'antigène présenté, généralement, par une APC. L'environnement cytokinique, produit par les DC ou autres types cellulaires, va favoriser la différenciation des LT CD4 en sous-type particulier. Les facteurs de transcription et les voies de signalisation impliquées dans chaque sous-type sont différents et aboutissent à la genèse de sous-types (Th1, Th2, Th9, Th22, iTreg, Th17 et TFh) ayant des propriétés et des fonctions propres.

### III. La tolérance centrale et périphérique

Il est nécessaire d'avoir des contrôles de la réactivité des lymphocytes pour éviter une réponse contre les cellules de l'organisme. Les lymphocytes sont dits tolérants envers les cellules du soi, correspondant à un état de « non-réponse » vis à vis d'un antigène. On distingue la tolérance centrale et la tolérance périphérique.

La tolérance centrale se déroule au moment du développement des lymphocytes, par la destruction des LT et LB auto-réactifs. Les mécanismes de tolérance centrale principaux sont la délétion clonale pour les LT et LB, et l'intervention des nTreg pour les LT. Les lymphocytes avec un TCR ou BCR ayant une affinité trop forte pour le complexe CMH-peptide du soi constituent un risque pour l'organisme et le développement de maladie auto-immune. Les lymphocytes auto-réactifs peuvent subir une délétion clonale (élimination), une anergie clonale (arrêt de maturation, état d'inactivation) ou une révision clonale (réarrangement du gène TCR $\alpha$  ou recombinaison des gènes de l'Ig)<sup>49 50</sup>. De plus, au sein du thymus, les LT CD4 exprimant un TCR auto-réactif de forte affinité vont subir une sélection négative, mais une partie de ces LT CD4 va se différencier en nTreg, identifiés par leur expression du récepteur à l'IL-2, le CD25, ainsi que leur facteur de transcription canonique FOXP3.

La tolérance périphérique intervient lorsque des LB ou LT auto-réactifs ne sont pas éliminés au niveau des PLO. Elle fait appel à des mécanismes similaires dont i) la délétion clonale menant à l'apoptose, ii) l'anergie qui peut être à l'issue d'une interaction avec des DC tolérogéniques présentant un peptide aux LT auto-réactifs, mais ne fournissant pas les signaux adéquats pour leur activation et prolifération, et iii) le développement d'iTreg à partir de LT CD4 naïfs<sup>51</sup>. Les nTreg vont également jouer un rôle dans la tolérance périphérique et sont caractérisés par la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-35 et TGF- $\beta$ ), l'interaction directe cellule-cellule (via l'interaction CTLA-4/CD28 notamment) conduisant à l'anergie du LT auto-réactif. L'anergie est un état réversible qui est caractérisé par une répression de la signalisation du TCR et de l'IL2.

## Chapitre 2 : Rôle des lymphocytes T folliculaires auxiliaires ou TFh (« T Follicular Helper cells ») dans la réponse humorale

### I. Développement et implication des TFh dans la réaction du centre germinatif

#### A) Découverte des lymphocytes T folliculaires (TFh)

En réponse à une infection, l'un des mécanismes de défense mis en place par le système immunitaire est la production, par les LB, d'anticorps de haute affinité spécifiques aux agents infectieux. La supposition de l'existence des lymphocytes T folliculaires auxiliaires a été initiée en 1968, lorsque Miller et Mitchell ont découvert que les thymocytes avaient un rôle dans l'induction de la sécrétion d'anticorps par les LB<sup>52</sup>. Ces cellules ont été progressivement caractérisées et nommées pour la première fois, en 1972, comme étant des lymphocytes T auxiliaires (« Helper T cells ») pour définir les cellules du thymus capables d'aider les LB<sup>53</sup>. La caractérisation des TFh se précisera dans le temps à mesure que celle des LB va progresser, et particulièrement avec les études menées sur les centres germinatifs des amygdales humaines. Elle est l'aboutissement d'une série d'observations sur plusieurs années qui ont permis la définition des TFh que l'on connaît aujourd'hui, c'est à dire un sous-type de cellules immunitaires bien distinct. La collaboration entre les LT et LB a été démontrée lorsque l'ajout de facteurs de croissance et de différenciation sécrétés par les LT CD4 en combinaison avec un anticorps anti-IgM a permis la prolifération et la différenciation de LB quiescents en cellules capables de synthétiser des immunoglobulines. A cette époque, les LT CD4 n'étaient divisés qu'en deux populations, les Th1 et les Th2, en fonction de leur sécrétion de cytokines. Chez la souris, la découverte de l'IL-4 comme étant une cytokine qui pouvait, en combinaison avec la mise en place des voies de signalisation induites par l'activation du BCR, participer à la prolifération des LB a mené à la conclusion que les Th2, sécrétrices d'IL-4, étaient les cellules spécialisées dans l'aide aux LB. Cependant, la déplétion des gènes associés au Th2 (souris déficiente en IL-4 ou IL-5), *in vivo*, n'induisait pas de perte ou de malformation des centres germinatifs, ni de défaut d'activation des LB après un challenge antigénique, remettant ainsi en doute l'implication des Th2 dans la fonction observée<sup>54</sup>.

Dès 1986, de nouvelles études ont permis d'éclaircir les mécanismes impliqués dans cette relation LT/LB avec notamment la découverte du CD40, exprimé par les LB, et de son ligand CD40-L, fortement exprimé par les LT CD4 activés, comme molécule de co-stimulation impliquée dans l'interaction LT CD4 et LB<sup>55</sup>. En effet, les patients atteints du syndrome d'hyper IgM causé par des mutations du CD40 ou CD40-L ont un taux élevé d'IgM dans le sérum mais un taux très réduit d'IgG, d'IgA et d'IgE. L'étude de cette pathologie a permis de révéler que l'interaction CD40/CD40-L est essentielle pour promouvoir la survie, la prolifération et la commutation de classe des LB<sup>56</sup>. L'ensemble

de ces données a permis de décrire un des mécanismes nécessaires à la différenciation des LB dans les centres germinatifs (GC) <sup>57</sup>.

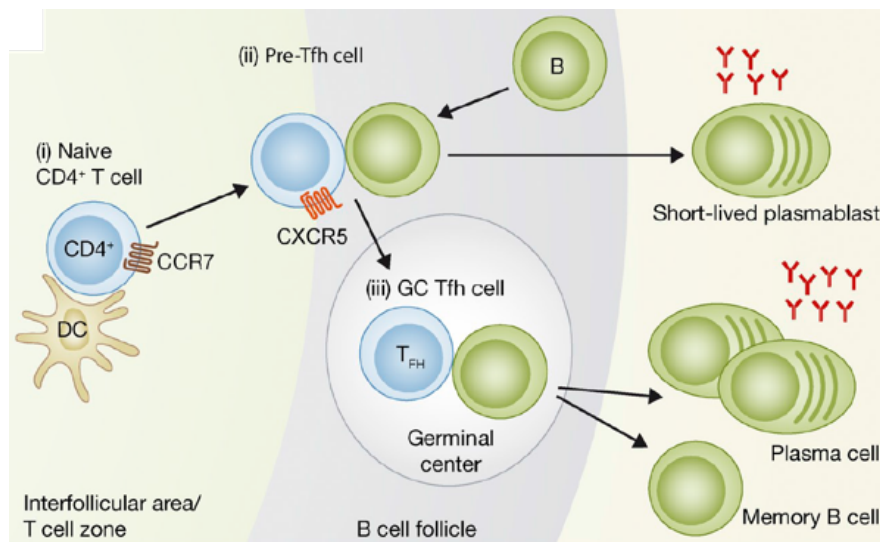
Il a été observé, chez la souris, une étroite interaction entre les LT CD4 et les LB au niveau de la jonction entre la zone T et B des centres germinatifs <sup>58</sup>. Un récepteur aux chimiokines, BLR1, a été pour la première fois décrit dans les cellules du lymphome de Burkitt et les LB <sup>59</sup>. La délétion des gènes de BLR1 chez la souris aboutit à la formation de follicules primaires et de centres germinatifs anormaux dans la rate et les plaques de Peyer, témoignant d'un défaut de maturation des LB dans ces zones <sup>60</sup>. Legler et al., ont proposé, en 1998, en adéquation avec la nomenclature, le terme de CXCR5 (CXC-chemokine receptor 5) pour désigner BLR1 du fait de sa fonction spécifique de chimioattraction des LB <sup>61</sup>. Il a donc été supposé que les LT CD4 interagissant avec les LB, au niveau des follicules, pouvaient exprimer CXCR5 et/ou son ligand, CXCL13 (CXC-chemokine ligand 13), de façon à promouvoir leur co-localisation avec les LB.

En 2000, l'histoire se poursuit avec la découverte et le clonage d'une cytokine : l'interleukine 21 (IL-21). Il a été montré que l'IL-21 joue un rôle crucial dans la différenciation des LB naïfs et mémoires en plasmocytes sécréteurs d'anticorps, et ceci de façon synergique avec l'engagement du CD40 et de l'IgM<sup>62</sup>. En parallèle, des molécules essentielles dans le contact direct entre LT et LB ont été décrites : ICOS (inducible T cell co-stimulator) et SAP (SLAM-associated protein). En effet, il a été observé, chez une souris déplétée en ICOS (ICOS<sup>-/-</sup>), un déficit important dans le changement de classe isotypique des immunoglobulines, accompagné d'une altération de la formation des centres germinatifs <sup>63</sup>. De même, les patients déficients en ICOS présentent une réduction importante du nombre de LB et un défaut dans la génération de LB mémoires. Ces altérations sont accompagnées d'un déficit de formation, maturation, fonction des GC dans les ganglions lymphatiques<sup>64</sup>. La molécule SAP présente sur les LT CD4, et non celle sur les LB, a été montrée comme impliquée dans la génération d'une réponse humorale à long terme<sup>65</sup>. C'est donc en 2000 que l'existence des TFh comme sous-type de LT CD4 spécialisé dans l'aide aux LB fut proposée mais l'existence des TFh ne fut réellement acceptée qu'en 2009 suite à l'identification de Bcl-6 (B cell lymphoma 6) comme facteur de transcription canonique des TFh. En effet, il est responsable de la différenciation des LT CD4 naïfs en TFh ainsi que de leur développement, et ceci de façon indépendante de la différenciation en Th1, Th2 ou Th17<sup>66 67 68</sup>. Cette découverte a permis d'accélérer considérablement leur étude les années qui ont suivies. Les TFh possèdent à la fois un profil d'expression génique qui les distingue des autres sous-populations de LT CD4, mais également un profil d'expression de molécules membranaires qui reflète l'importance de l'interaction TFh:LB pour leur fonction. Les TFh humains expriment des marqueurs qui sont largement similaires aux marqueurs des TFh murins. Toutefois, il existe des différences entre l'Homme et la souris, et notamment dans les cytokines impliquées dans le processus de différenciation. Il est admis que, chez l'Homme et la souris, les TFh sont définis par l'expression d'un ensemble de marqueurs tels que

**CXCR5, ICOS, PD-1, CD40-L, Bcl-6**, leur localisation folliculaire *in vivo*, ainsi que leur sécrétion d'**IL-21**. Il est à noter que, chez l'Homme, les cellules productrices d'IL-21 seulement, ne peuvent pas être définies comme des TFh. Il est nécessaire d'utiliser d'autres marqueurs de différenciation car d'autres LT CD4 humains comme les Th17 sont capables de sécréter une quantité non négligeable d'IL-21<sup>69</sup>.

## B) La différenciation des TFh et la mise en place de la réponse des LB : processus en plusieurs étapes

La différenciation d'un LT CD4 naïf en TFh est un processus comprenant de nombreuses étapes et nécessitant l'engagement de signaux de co-stimulation positifs et négatifs. C'est un processus complexe qui se déroule dans un cadre spatio-temporel bien défini qui implique une séquence d'interactions avec différentes populations d'APC comme les DC dans la zone LT des organes lymphoïdes, mais également avec les LB activés à la bordure de la zone LT et du follicule. La différenciation des TFh peut donc être ainsi divisée en deux parties : i) l'initiation de la différenciation en TFh par une DC, de façon dépendante de la présentation d'antigène, ii) le maintien du phénotype et la maturation des TFh par l'interaction TFh:LB (**Figure 5**).



**Figure 5: Localisation anatomique et interactions cellulaires nécessaires à la génération de TFh, de Ma et al., 2012<sup>70</sup>.**

La différenciation des TFh nécessite une interaction successive avec les DC puis les LB. i) les LT CD4 naïfs sont activés dans les zones inter-folliculaires, correspondant à la zone LT du SLO, par la reconnaissance du complexe CMHII-peptide présenté par les DC. L'induction de l'expression des premiers marqueurs des TFh permet de générer des pré-TFh, ii) Les pré-TFh vont migrer au niveau de la bordure entre la zone LT et LB pour interagir avec des LB activés permettant aux pré-TFh d'acquérir un phénotype mature, iii) Les TFh et les LB vont ensuite migrer dans le follicule avec un phénotype complètement différencié. A ce stade, les GC TFh vont pouvoir assurer leur fonction en soutenant la réaction du GC et facilitant la génération de LB mémoires et plasmocytes.

### a. Interaction avec les DC : mise en place d'un profil « pré-TFh »

D'un point de vue spatio-temporel, l'initiation de l'induction d'un phénotype TFh chez un LT CD4 naïf se déroule au niveau de la zone T des SLO. L'enjeu des différentes étapes qui vont suivre va être d'aboutir à un pré-TFh exprimant toutes les molécules qui vont lui permettre de poursuivre sa maturation et sa fonction au contact des LB.

Les LT CD4 naïfs expriment à un haut niveau CCR7, ce qui va promouvoir leur migration dans les zones extra-folliculaires riches en CCL19 et CCL21, sécrétées notamment par les cellules fibroblastiques réticulaires, dans les tissus lymphoïdes<sup>71</sup>. La reconnaissance par le TCR des complexes peptide-CMHII exprimés sur les DC dans les zones T des tissus lymphoïdes secondaires déclenche une expansion clonale et une différenciation rapide en sous-types d'effecteurs distincts et spécialisés dans la « défense » contre différentes classes de microbes. La différenciation précoce des LT CD4 naïfs va déterminer un engagement i) vers les LT effecteurs « classiques » (Th1, Th2, Th17) qui vont migrer vers les tissus non lymphoïdes, ii) ou vers les TFh qui vont circuler au sein des follicules des SLO, au contact des LB qui vont être un acteur clé de leur différenciation. La « décision » de devenir un TFh par rapport aux autres possibilités de différenciation d'un LT CD4 se met en place dans les deux premières divisions cellulaires.

#### 1- Initiation du profil TFh par la signalisation du TCR et les molécules de costimulation

La polarisation du LT CD4 en TFh est initiée par la reconnaissance de l'antigène présenté par les DC, les molécules de costimulation mises en jeu ainsi que les voies de signalisation induites par ces interactions. La force du signal TCR va être un facteur important dans le choix de différenciation d'un LT CD4 naïf car elle engendre, entre autres, un engagement plus ou moins long des molécules de costimulation mais également module le temps d'exposition aux cytokines. En effet, un LT CD4 avec un TCR de forte affinité va se différencier préférentiellement en TFh<sup>72 73</sup>. L'engagement du TCR va notamment aboutir à l'expression du facteur **IRF4** (interferon regulatory factor 4)<sup>74 75</sup>. Ce dernier va promouvoir la différenciation des LT CD4 naïfs en Th2, Th17, Th9 ou en TFh. Dans le même temps, les voies de signalisation induites par l'interaction entre la molécule costimulation CD28, exprimée constitutivement par les LT CD4 naïfs, avec ses ligands CD80 ou CD86 exprimés par les DC, va participer à la mise en place des premiers marqueurs des TFh : **PD-1, OX40, CXCR5, ICOS** et **Bcl-6**<sup>76</sup>.

## 2- Initiation par les cytokines

Une des différences majeures entre le modèle murin et l'Homme se trouve dans l'implication des cytokines dans le processus de différenciation des TFh. Chez la souris, **L'IL-6**, produite notamment par les DC incluant les DC folliculaires murines, est un régulateur précoce de la différenciation des TFh. En effet, les LT CD4 de souris déficiente en IL-6, dans un contexte infectieux, présentent une altération de l'expression de CXCR5 et de Bcl-6 durant la phase de priming par les DC, et ceci de manière **STAT-1 et STAT-3** dépendantes<sup>78</sup>. A travers l'activation de ces deux facteurs STAT, l'IL-6 va restreindre l'expression de l'IL-2R $\alpha$  à la surface du LT CD4 (TFh en devenir) limitant ainsi la différenciation en Th1. Le contrôle de **l'IL-2** est un axe majeur dans la détermination du profil TFh, chez la souris, puisque cette cytokine va notamment activer la voie de signalisation de **STAT5**, qui à son tour va induire l'expression de Blimp-1 en se fixant directement sur son promoteur entraînant ainsi l'inhibition de Bcl-6<sup>79 80 81</sup>. L'IL-6 va également être impliquée dans l'augmentation de la production d'IL-21 en induisant notamment l'expression de c-Maf (Musculoaponeurotic fibrosarcoma) dans les LT CD4, qui va ensuite pouvoir se fixer directement sur le promoteur de l'IL-21 et induire son expression<sup>82 83 84</sup>. De même, chez la souris, la production d'**IL-27** par une DC préalablement activée, participe à l'induction de Bcl-6 et la sécrétion d'IL-21 par les LT CD4 naïfs<sup>1</sup>. La neutralisation du récepteur à l'IL-27 (souris IL-27R $\alpha^{-/-}$ ) induit un défaut dans le développement et l'activité des GC *in vivo* indiquant que cette cytokine est impliquée dans les phases précoces de développement des TFh<sup>86</sup>. Une étude a montré qu'une souris déficiente en IL-21 (IL-21 $^{-/-}$ ) possède un nombre réduit de TFh. D'autres travaux ont démontrés l'implication de l'IL-21, en plus de son rôle dans la fonction des TFh, dans l'induction de Bcl-6 et donc dans la différenciation en TFh des LT CD4 naïfs<sup>87 66</sup>. La présence du récepteur de l'IL-21, IL-21R, sur les TFh et l'absence de sécrétion d'IL-21 par les DC suggèrent un effet autocrine de l'IL-21 sur les TFh. Cette cytokine va donc participer à la différenciation en favorisant notamment l'expression optimale de CXCR5<sup>88</sup>.

Chez l'Homme, ce sont d'autres cytokines telles que **l'IL-12**, **l'IL-23**, **l'activine A** et le **TGF- $\beta$**  qui jouent un rôle majeur dans la différenciation des TFh. Les DC activées vont sécréter de l'IL-12 qui va induire ensuite la sécrétion d'IL-21 par des LT CD4 naïfs de façon STAT4 dépendante. L'inhibition de l'IL-12 dans une co-culture entre DC et LT CD4 naïfs humains, *in vitro*, aboutit à une diminution importante de la sécrétion d'IL-21 par les LT CD4. Chez l'Homme, l'IL-12 induit une plus forte expression de CXCR5, ICOS, Bcl-6 et IL-21 sur les LT CD4 naïfs activés que l'IL-6, l'IL-21 et l'IL-27<sup>89 90</sup>. En effet, chez la souris, l'activation de STAT4 par l'IL-12 va induire l'expression d'IL-21 et Bcl-6 mais également l'expression de T-bet. L'expression de T-bet ainsi que de l'IFN $\gamma$  va finalement réprimer l'expression des gènes impliqués dans le phénotype TFh<sup>91</sup>. Le TGF- $\beta$  va, quant à lui, potentialiser l'effet de l'IL-12 et de l'IL-23 en participant à l'expression de CXCR5, ICOS, IL-21, Bcl-



6, c-Maf, Batf et à l'inhibition de Blimp-1<sup>89</sup>. Ceci contraste également avec la souris, où le TGF- $\beta$  participe à la suppression de l'expression d'ICOS, de Bcl-6 et de l'IL-21<sup>92</sup>. En ce qui concerne l'activine A, elle est impliquée, entre autres, dans la diminution de CCR7 et l'expression de CXCR5 et PD-1. Son action en synergie avec l'IL-12, va également promouvoir l'expression d'une centaine de gènes spécifiques en plus du CXCR5 et PDCD1 (qui code pour PD-1)<sup>93</sup>. Il est à noter que, l'activation des voies de signalisation induites par l'activine A et par le TGF- $\beta$  aboutissent à la phosphorylation de Smad2/3, expliquant leurs rôles redondants dans la différenciation des TFh.

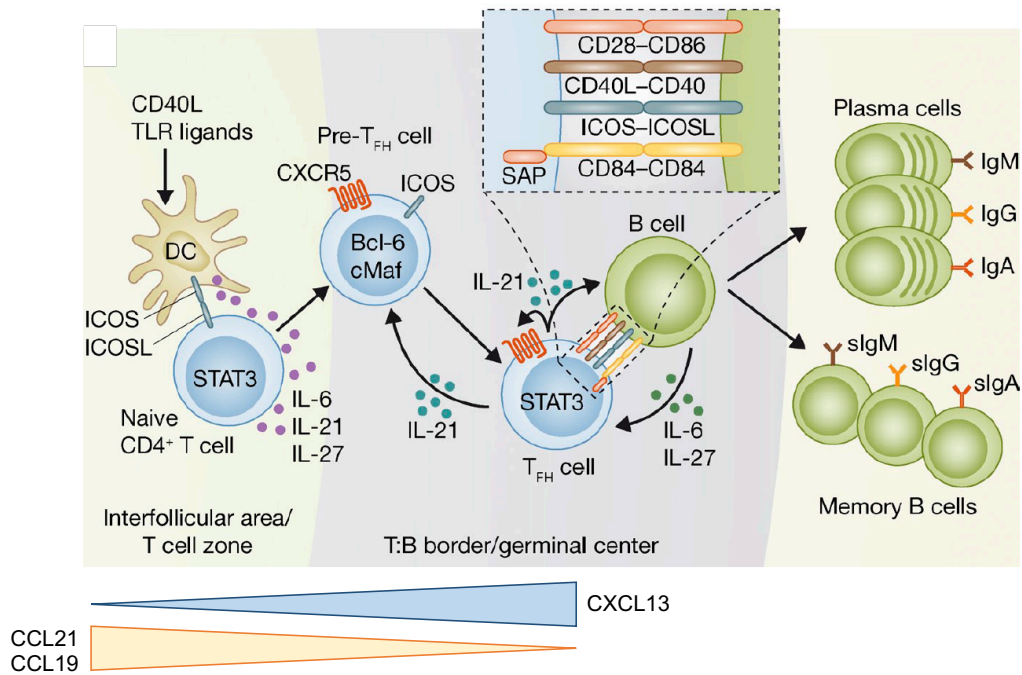
### **b. Interaction avec les LB : acquisition du phénotype TFh mature**

A ce stade, le LT CD4 naïf est devenu un pré-TFh par l'activation des voies de différenciation permettant l'expression, ainsi que le maintien de l'expression, de Bcl-6, PD-1, ICOS, CXCR5 et la sécrétion d'IL-21. L'interaction pré-TFh:LB est essentielle pour le maintien du phénotype des TFh puisqu'en absence de LB, celui-ci est perdu après plusieurs cycles de division<sup>94</sup>. L'acquisition de CXCR5 associée à la diminution de l'expression de CCR7 va permettre la migration des pré-TFh vers la bordure LT:LB, en réponse au CXCL13 sécrété par les cellules folliculaire réticulaires<sup>95 96</sup>. L'expression de CXCR5 est suffisante pour la migration des pré-TFh au niveau de la bordure LT:LB mais reste insuffisante pour leur localisation à l'intérieur du follicule<sup>97</sup>. Les molécules PSGL-1 et CCR7 vont être capables de contrôler la localisation des TFh vers des sites inflammatoires, ce qui rend leur diminution d'expression extrêmement importante dans le processus de différenciation des TFh<sup>98 99</sup>. Pour cela, les TFh et les LB vont réguler à la baisse CCR7 et EB12 et maintenir une expression stable de CXCR5, leur permettant ainsi d'échapper à l'attraction des chimiokines CCL19 et CCL21 de la zone LT.

En parallèle, les DC folliculaires présentes dans le follicule vont organiser la structure des GC et vont notamment présenter des complexes immuns aux LB via le BCR<sup>100 101 14</sup>. L'antigène va ensuite être « préparé » pour être présenté sous forme de peptide lié au complexe CMHII par les LB. L'activation des LB par les DC folliculaires va également induire une forte expression de CMHII ainsi que des molécules de co-stimulation telles que CD80 et CD86, optimisant leur fonction de cellules présentatrices d'antigène. L'activation des LB va également s'accompagner d'une augmentation de l'expression de CCR7, dont les ligands, CCL21 et CCL19 sont fortement exprimés dans la zone T permettant ainsi la migration des LB au niveau de la zone LT:LB où ils vont interagir de manière antigène-spécifique avec les pré-TFh<sup>58 102</sup>. L'expression contraire de CCR7 sur les LB et les pré-TFh va leur permettre, suivant le gradient de chimiokines, de se retrouver à l'interface entre la zone LT et LB (**Figure 6**).

Au niveau de la bordure LT:LB, les LB vont jouer un rôle d'APC via la reconnaissance spécifique de ce complexe CMHII- antigène par les pré-TFh<sup>103 104</sup>. Plusieurs molécules vont être engagées lors de cette interaction, telles que l'interaction des molécules de costimulation **CD40/CD40-L**, **ICOS/ICOS-L**, **OX40/OX40-L** ainsi que les molécules de la famille **SLAM** (signalling lymphocyte activation molecular associated protein) correspondant à une famille de 9 récepteurs de surface allant de SLAM-1 à SLAM-9. L'interaction entre les pré-TFh et les LB va induire, via l'axe CD40/CD40-L, l'augmentation d'**EBI2** (Epstein-Barr virus-induced G protein coupled receptor 2) par les LB<sup>105</sup>. Les deux types cellulaires vont réguler positivement EBI2 ce qui va faciliter leur localisation à la frontière LT:LB<sup>106 107</sup>. Les cellules stromales à l'intérieur et l'extérieur du follicule vont contrôler l'expression des ligands oxysterol d'EBI2 ce qui va participer à cette co-localisation des LT et LB EBI2+<sup>108 109</sup>. L'interaction avec les LB va induire une plus forte expression de Bcl-6 par les pré-TFh. Cette augmentation est associée à une expression prolongée de CXCR5 par les pré-TFh<sup>110 111</sup>.

La formation du GC nécessite que les TFh et LB activés migrent vers le follicule à partir de la frontière LT:LB sous forme de LB<sub>GC</sub> et GC TFh (TFh du centre germinatif) complètement différenciés. Leur migration vers le centre du follicule est dépendante de la diminution de l'expression d'EBI2 ainsi que de l'augmentation de **S1PR2** (S1P receptor 2) qui va se lier à S1P, exprimé en plus forte concentration dans le follicule<sup>112</sup>. Il a notamment été montré, chez la souris, que la perte d'expression de S1PR2 va réduire la capacité des TFh à se situer au centre du follicule, et sa perte combinée avec celle de CXCR5 met fin à la localisation des TFh dans le GC<sup>113 114</sup>. En outre, il a été montré que les LB déficients en EBI2 vont préférentiellement se localiser à l'intérieur du follicule. A l'inverse, une surexpression d'EBI2 par les LB est suffisante à leur localisation en dehors du follicule<sup>115</sup>. Chez l'Homme, les GC TFh expriment les niveaux les plus élevés de Bcl-6 et CXCR5 parmi les LT CD4 des amygdales (CXCR5<sup>hi</sup> vs CXCR5<sup>int</sup>)<sup>116</sup>. Les GC TFh correspondent à un état de maturation supplémentaire par rapport aux pré-TFh notamment dû à une forte activation des molécules de costimulation et du TCR induit par les LB<sub>GC</sub>.



**Figure 6: Interactions moléculaires entre les pré-TFH et les LB à la bordure LT:LB, adapté de Ma et al., 2012 <sup>70</sup>.**

L'interaction entre les DC et les LT CD4 naïfs va notamment permettre l'induction de l'expression de CXCR5 et Bcl-6. L'interaction avec les molécules de costimulation dont CD28/CD80/CD86, l'activation de la voie de signalisation du TCR ainsi que la production de cytokines par les DC, IL-12, IL-23 et TGF- $\beta$  chez l'Homme, et IL-6, IL-21 et IL-27 chez la souris, va favoriser l'expression de Bcl-6, c-Maf, IRF4, Batf, STAT3, ICOS et CXCR5 ainsi que la production d'IL-21 par les pré-TFH. La relocalisation des pré-TFH Bcl-6+CXCR5+ à la frontière LT et LB permet des interactions ultérieures avec les LB activés qui va permettre de stabiliser le phénotype des pré-TFH en TFH. La migration des pré-TFH Bcl-6+CXCR5+ à la frontière LT :LB va être guidée par le gradient de CCL21 et CCL19 dans la zone T, et celui de CXCL13 dans le GC. Les pré-TFH activés vont avoir une expression augmentée de CXCR5 et de EBI2, et une diminution de l'expression de CCR7 et PSGL-1, leur permettant d'être plus sensible au gradient de CXCL13. A l'inverse, les LB activés vont surexprimer CCR7, les rendant ainsi sensible au gradient CCL21/CCL19 de la zone T. Les LB et pré-TFH vont établir une interaction stable via notamment CD40/CD40-L, ICOS/ICOS-L, CD28/CD86 ainsi que via l'interaction des molécules de la famille SLAM. L'engagement de ces molécules va être également essentiel au sein du GC pour permettre la survie et la différenciation des LB<sub>GC</sub>.

### c. Interaction des TFh et des LB au niveau du GC : mise en place de la réponse humorale

Les TFh jouent un rôle crucial dans l'orchestration de la réponse humorale. Les TFh matures se localisent dans les GC pour faciliter la maturation d'affinité des Ig, la recombinaison des classes, la survie des LB ainsi que la génération de plasmocytes de longue durée de vie et des LB mémoires. La mise en place de la réponse humorale nécessite que le follicule primaire, ne contenant que des LB, devienne un follicule secondaire grâce à la formation du GC. La mise en place du GC va nécessiter 1) la différenciation des TFh via leur rencontre avec les DC dans la zone T, puis avec les LB à la bordure du follicule, 2) l'activation des LB par les cellules dendritiques folliculaires (FDC), 3) l'activation des

LB à la bordure LT:LB, 4) l'entrée des TFh matures dans le GC où ils vont pouvoir y exercer leur fonction d'aide aux LB (**Figure 7**). L'ensemble de ces interactions entre les TFh et les LB va permettre la stabilisation du phénotype TFh, qui, à son tour, va fournir des signaux permettant aux LB d'entrer dans un cycle de division et de différenciation. Ainsi, les LB et les TFh sont réciproquement dépendants les uns des autres pour la survie, la prolifération et la différenciation au sein du GC.

Pour rappel, les GC sont des sites micro-anatomiques composés d'une zone claire (LZ) contenant les GC TFh, les FDC et les LB<sub>GC</sub> ; ainsi que d'une zone sombre (DZ) composée des LB<sub>GC</sub> proliférant. Dans les GC, les LB<sub>GC</sub> circulent entre ces deux zones. Dans la LZ, les LB<sub>GC</sub> vont lier l'antigène et présentent le complexe CMH-peptide aux TFh. Les GC TFh vont délivrer des signaux de survie et de prolifération aux LB<sub>GC</sub> affins permettant ensuite leur migration dans la DZ. Une fois dans celle-ci, les LB<sub>GC</sub> vont subir une nouvelle étape de prolifération et d'hypermutation somatique permettant de générer des BCR avec un spectre d'affinité différent pour l'antigène. Ces LB vont retourner dans la LZ où seuls les LB de forte affinité seront sélectionnés par les TFh pour une nouvelle série de prolifération et de mutation. Il s'agit d'un processus, se déroulant sur plusieurs jours voire semaines, d'induction de prolifération et de sélection par les GC TFh au fur et à mesure que celui de la maturation d'affinité s'effectue. Les signaux d'aide fournis par les TFh aux LB<sub>GC</sub> passent par de multiples voies dont les cytokines et les récepteurs de surface comme IL-21 et CD40-L, ICOS, OX40 et PD-1.

La ségrégation entre la LZ et DZ, nécessaire au bon fonctionnement du GC, est permise grâce à l'axe CXCR5/CXCL13 et CXCR4/CXCL12. En effet, CXCR4 est fortement exprimé sur les LB<sub>GC</sub> humains et murins<sup>117</sup>. La distribution de son ligand CXCL12 est davantage dans la DZ que la LZ suggérant que la localisation des LB<sub>GC</sub> dans la DZ est dépendante de CXCR4<sup>118</sup>. En effet, des souris déficientes en CXCR4 ont un défaut de polarisation des GC, avec un réseau de FDC présent dans l'ensemble du GC. A l'inverse, l'expression de CXCR5 et CXCL13 va permettre de définir la localisation dans la LZ. Suite à la diversification de leur BCR dans la DZ, il a été montré que les LB<sub>GC</sub> ayant subi une mutation somatique vont réduire l'expression de CXCR4 afin de migrer dans la LZ<sup>119</sup>.

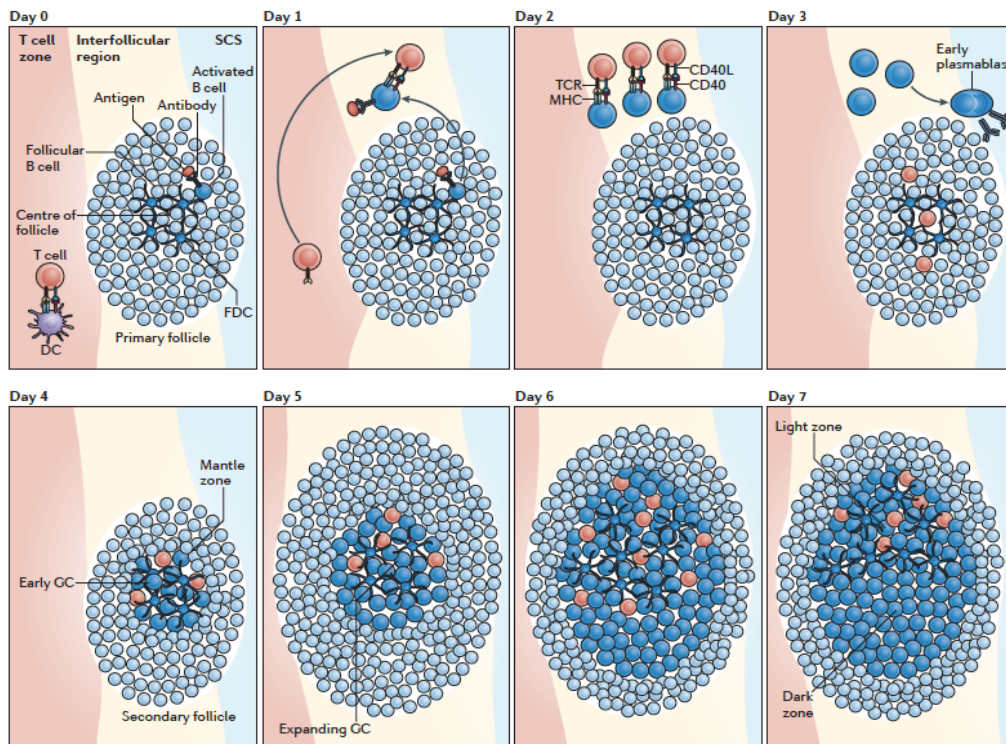


Figure 7 : Formation d'un centre germinatif dans le temps, de De Silva N., 2012<sup>120</sup>

Le GC est constitué d'une DZ, contenant des LB prolifératifs ou centroblastes qui subissent des SHM après avoir été activés, et d'une LZ, contenant les TFh et un réseau de FDC. Après environ 3 jours, les TFh différenciés et matures vont migrer dans le GC, devenant ainsi des GC TFh. La sélection des LB<sub>GC</sub> suffisamment affins pour l'antigène se réalise au niveau de la LZ, par leur interaction avec les GC TFh, et va induire la différenciation des LB<sub>GC</sub> en LB mémoires ou plasmocytes.

Les GC TFh vont réguler la génération et la sélection des LB<sub>GC</sub> ayant une plus grande affinité pour l'agent pathogène. Le succès de l'aide des TFh aux LB va dépendre de leur nombre mais également de leur affinité pour l'antigène<sup>121 103</sup>. En effet, les TFh vont préférentiellement interagir avec les LB possédant une expression plus élevée du complexe CMHII-peptide, mesurant ainsi indirectement l'affinité du BCR des LB<sup>122</sup>. Une aide importante de la part des TFh peut aboutir à une accumulation de mutations multiples du BCR d'un LB<sub>GC</sub>, ce qui va permettre le développement d'anticorps très affins et spécifiques. L'aide aux mutations du BCR est une ressource limitante clé dans les GC. En effet, les LB<sub>GC</sub> se retrouvent en compétition pour recevoir l'aide des GC TFh, sans quoi, les LB<sub>GC</sub> ne survivent pas. Les GC TFh vont diriger les LB<sub>GC</sub> ayant une affinité élevée pour l'antigène vers la différenciation en plasmocytes (de courte ou longue durée de vie) ou en LB mémoires par des mécanismes moléculaires différents, et leur sortie du GC (Figure 8).

### Implication des cytokines

L'IL-21 sécrétée en grande quantité par les GC TFh (CXCR5<sup>hi</sup>) va être impliquée dans le switch isotypique des LB<sub>GC</sub> ainsi que dans la régulation de Bcl-6 chez les LB<sub>GC</sub>, notamment via l'activation de

STAT3, capable de se lier au promoteur de Bcl-6 pour induire son expression<sup>123 124</sup>. De même, un défaut d'IL-21R entraîne une perte de switch vers l'IgG, mais plus globalement un défaut de maturation des LB (absence de commutation de classe des Ig)<sup>88</sup>. En combinaison avec l'interaction CD40/CD40L, il a été montré que l'IL-21 participe à la formation de plasmocytes sécrétant des IgG ou IgE<sup>62 125</sup>. Chez l'Homme, l'IL-21 et l'IL-4 sécrétées par les GC TFh ont été impliquées dans l'induction de la recombinaison des IgG1 pour les LB. En outre, l'IL-21 est importante pour obtenir le nombre maximal de LB<sub>GC</sub> et assurer la longévité du GC déterminée par un grand nombre de cycles de mutation et prolifération des LB<sub>GC</sub>. Enfin, il a été montré que l'absence d'IL-21 entraîne un défaut de maturation du BCR et une expression diminuée de Bcl-6 par les LB<sub>GC</sub>.

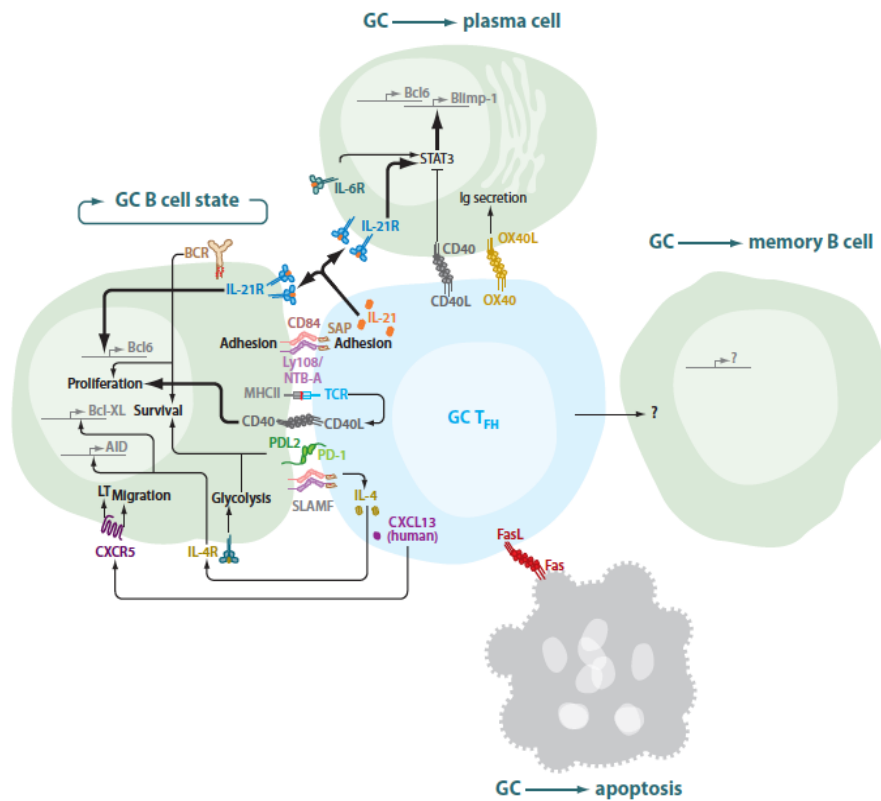
Les GC TFh vont être capables de sécréter des cytokines qui vont participer, en combinaison avec les molécules de costimulation, à l'orientation de la différenciation des LB<sub>GC</sub> en influençant notamment la CSR. Contrairement aux GC TFh murins, les GC TFh humains vont pouvoir sécréter de l'IL-10, qui va être importante dans la survie des LB<sub>GC</sub> et la différenciation en plasmablastes puis en plasmocytes sécrétant d'IgM, d'IgG et/ou IgA<sup>126</sup>. L'IL-4 s'est révélée être également impliquée dans la taille et le maintien des GC<sup>127</sup>, en influant notamment sur le processus de sélection des LB<sub>GC</sub>. L'engagement d'ICOS/ICOS-L entre les LB<sub>GC</sub> et les GC TFh va être un déclencheur essentiel pour la production de ces cytokines (IL-10, IL-2, IL-21, IL-4). La sécrétion de cytokines par les TFh mais également par les cellules avoisinantes telles que les FDC vont permettre de créer un environnement qui va impacter le type de plasmocytes générés (**Tableau 1**).

Ig	IgM	IgD	IgG1	IgG2	IgG3	IgG4	IgA1	IgA2	IgE
IL-4			+			+			+
IL-10	+		+		+		+	+	
IL-10 + TGF-β							+	+	
IL-13			+			+			+
IL-15	+		+				+	+	
IL-21	+	+	+	+	+	+	+	+	+
IL-12 + IL-6	+								

**Tableau 1 : Contribution des différentes cytokines à la CSR chez les LB humains, inspiré de Moens et Tangye 2014<sup>128</sup>.**

En fonction des cytokines présentes dans l'environnement, les LB<sub>GC</sub> vont se différencier en plasmocytes sécrétant des isotypes d'Ig différente afin de s'adapter au mieux à l'agent pathogène.

Les signaux qui induisent la différenciation des LB<sub>GC</sub> en LB mémoires sont encore mal connus. La différenciation en LB mémoires est proposée comme un processus par défaut en absence des signaux nécessaires au programme de différenciation en plasmocyte. Chez l'Homme, il a été suggéré que les signaux issus du CD40 permettent la différenciation *in vitro* des LB<sub>GC</sub> en LB mémoires plutôt qu'en plasmocytes<sup>129</sup>. Certaines études ont proposé que, selon l'affinité du BCR, les LB vont préférentiellement se différencier en plasmocytes ou en LB mémoire, mais cela nécessite des investigations supplémentaires<sup>130</sup>.



**Figure 8 : Mécanismes moléculaires induits par les GC TFh pour la différenciation des LB<sub>GC</sub>, de Crotty, 2011<sup>131</sup>.**

La régulation de la différenciation des LB<sub>GC</sub> par les GC TFh implique de nombreuses molécules. Les GC TFh vont être nécessaires pour la survie et la prolifération des LB<sub>GC</sub> (à gauche), pour l'induction de la différenciation en plasmocyte (en haut) et en LB mémoire (à droite). Les GC TFh vont également participer à l'induction de l'apoptose des LB<sub>GC</sub> (en bas).

### C) Facteurs de transcription (FT) et molécules impliquées dans la différenciation et l'interaction entre les TFh et les LB

#### a. Facteurs de transcription

Tout au long du processus de différenciation des TFh, l'induction ou la répression de l'expression de différents FT va être essentielle pour aboutir à un phénotype de TFh mature.

## Bcl-6

Un ensemble d'éléments va être responsable de l'induction de Bcl-6, facteur de transcription indispensable à l'induction de la différenciation des LT CD4 en TFh. Une étude menée sur un modèle de souris déficiente en Bcl-6 (souris Bcl-6<sup>-/-</sup>) a montré qu'en son absence, la différenciation des TFh n'a pas lieu, sans que celle des autres populations de LT CD4 effecteurs n'en soit affectée<sup>67</sup>. A l'inverse, une expression constitutive de Bcl-6, *in vivo*, induit la différenciation des LT CD4 en TFh. L'une des fonctions de Bcl-6 va être de réguler l'expression de multiples **micro-ARN** afin de permettre l'expression du pattern génétique des TFh. En effet, il a été montré que la surexpression de Bcl-6 dans des cellules LT CD4 murines entraîne une sous expression de micro ARN tel que le cluster miR-17-92 intervenant dans la répression de CXCR5, ou miR-101 et miR-103 responsables de la suppression d'ICOS<sup>67 132</sup>. Cependant, une surexpression de Bcl-6 dans ces cellules n'engendre pas une surexpression d'ICOS mettant ainsi en évidence les multiples mécanismes impliqués dans l'induction de cette molécule, et plus largement dans l'ensemble de processus de différenciation en TFh. L'expression de Bcl-6 est fortement corrélée à celle de CXCR5 (ARNm et protéique) dans les TFh des GC, mais l'expression de CXCR5 peut être initiée de manière indépendante à celle de Bcl-6<sup>66</sup>. Une étude a notamment montré que la coopération entre Bcl-6 et c-Maf induit l'expression de **CXCR4, PD-1, SAP** et **ICOS** en orchestrant l'expression de gènes<sup>133</sup>.

En outre, Bcl-6 va jouer un rôle dans la répression de l'expression des gènes qui vont contrôler négativement le développement des TFh. En effet, Bcl-6 et Blimp-1 ont des effets antagonistes en réprimant mutuellement leur expression dans la cellule d'intérêt. Les TFh expriment Bcl-6 à un haut niveau mais pas Blimp-1, tandis que les « non-TFh » - faisant référence au Th1, Th2, Th17 et autres sous-types - expriment fortement Blimp-1 et pas Bcl-6<sup>68 67</sup>. Une surexpression ou une expression constitutive de Blimp-1 entraîne la suppression de Bcl6 et donc l'absence de génération de TFh ; et inversement, il a été montré chez la souris que Bcl-6 peut se fixer sur Prdm1 (gène de Blimp-1) pour en inhiber l'expression en interférant avec l'activateur AP-1<sup>134</sup>. Il est à noter que Blimp-1 n'empêche pas l'expression d'autres facteurs de transcription responsables de la différenciation des LT CD4 en un autre sous-type, contrairement à Bcl-6. En effet, chez l'Homme, il a été montré que Bcl-6 peut se lier directement au promoteur de RORγt afin d'inhiber la différenciation en Th17<sup>66</sup>. De même, Bcl-6 est capable d'inhiber GATA-3, facteur de transcription responsable de la différenciation des LT CD4 en Th2, ainsi que T-bet, impliqué dans la différenciation en Th1<sup>135</sup>.

## IRF4 (interferon regulatory factor 4), c-Maf et Batf (Basic leucine zipper transcription factor)

L'expression d'IRF4 par les TFh est impliquée dans la forte expression d'ICOS, de PD-1 et CXCR5, mais également dans la formation des GC. En effet, des souris déficientes en IRF4 présentent



un défaut dans la formation des GC et une absence d'expression des marqueurs des TFh par les LT CD4 présents dans les LN<sup>136</sup>. Comme IRF4 est responsable de l'initiation de plusieurs différenciations possibles, son expression est augmentée dans les cellules non polarisées à des stade précoces. En conséquence, selon l'intensité de la signalisation TCR, le complexe IRF4 peut s'associer avec **Batf** (Basic leucine zipper transcription factor), membre de la famille AP-1 (activator protein 1), permettant l'ouverture initiale de la chromatine pour faciliter l'assemblage des molécules STAT qui vont activer, selon l'environnement, les facteurs de transcription spécifiques tels que Bcl-6 et **c-Maf**<sup>137 138</sup>. Bcl-6 va permettre, d'une part, de favoriser l'expression de gènes impliqués dans le développement des TFh et, d'autre part, inhiber les autres voies de différenciation possibles.

L'expression de c-Maf va être impliquée dans la production des cytokines et la différenciation des Th2, Th17 et TFh. La perte de c-Maf dans les LT résulte en un défaut de production d'IL-21 par les Th17 et les TFh, mais également la diminution de l'expression de molécules clés pour les TFh telles que CXCR5, PD-1 et Bcl-6<sup>83 139</sup>.

L'expression de Batf dans les TFh est induite rapidement après la stimulation du TCR mais peut également être activée par la voie de signalisation de l'IL-6 via l'activation de STAT3, ainsi que par l'IL-4. Il a été montré que des souris déficientes en Batf (Batf<sup>-/-</sup>) échouent dans la génération de TFh. La surexpression de Bcl-6 et de c-Maf dans ces souris permet de restaurer le développement des TFh, mais pas à la hauteur d'une souris exprimant Batf, suggérant l'implication de l'ensemble de ces facteurs pour atteindre une différenciation optimale des TFh<sup>140</sup>. Par ailleurs, la formation du complexe Batf avec IRF4 va intervenir dans la régulation des gènes liés à l'IL-21 en coopération avec STAT3, mais également dans celle des gènes liés à l'IL-4 via STAT6<sup>141 142</sup>. Le complexe Batf-IRF4, ainsi que les facteurs de transcription STAT3 et STAT6, se lient à la région CNS2 du locus IL-4 ce qui promeut la production d'IL-4 dans les TFh. De même, IRF4 lui-même, le complexe IRF4-c-Maf (Musculoaponeurotic fibrosarcoma) ainsi que NFAT (Nuclear factor of activated T cell protein) sont capables d'induire l'expression d'IRF4 dans les TFh<sup>143</sup>. L'activation de c-Maf va également permettre à la cellule d'exprimer l'IL-4 en interagissant avec les facteurs de transcription NFAT et JunB<sup>144 145</sup>. NFAT2, fortement exprimé par les TFh, va également favoriser l'expression de CXCR5, ICOS et PD-1. Il a été montré que la délétion de NFAT1 conjointement à celle de NFAT2, chez la souris, entraîne une diminution de l'expression des marqueurs des TFh et un défaut d'activité des GC<sup>146</sup>. De même, l'activation des voies de signalisation d'ICOS va induire c-Maf qui va réguler la production d'IL-21 par les TFh et participer à la génération de TFh capables de sécréter de l'IL-17<sup>147</sup>.

## ASCL2 (Achaete scute homolog 2)

L'expression de **ASCL2**, facteur de transcription sélectivement surexprimé dans les TFh, est dépendant de l'activation de la voie Wnt<sup>148</sup>. Il est impliqué dans l'augmentation de l'expression de CXCR5 et la diminution de CCR7, PSGL-1 et des voies de signalisation de l'IL-2. L'inhibition de ce facteur va entraîner une inhibition complète du développement des TFh *in vivo*<sup>149</sup>. Il va également réprimer l'expression des gènes signatures des sous-types Th1 et Th17. L'origine de l'activation des voies Wnt reste encore à déterminer. Il a été montré que les DC folliculaires des amygdales humaines sont capables d'exprimer Wnt5a, un activateur de la voie non canonique de Wnt<sup>150</sup>. Cependant, l'activation de la voie canonique reste encore mal connue dans la différenciation des LT CD4, ici TFh, même si les facteurs en aval semblent être impliqués dans celle-ci.

## TCF-1 (T cell factor 1) et LEF-1 (Lymphoid enhancer-binding factor 1)

Des études ont mis en évidence, à partir de souris *Lef1<sup>-/-</sup>Tcf7<sup>-/-</sup>* (TCF-1), le rôle des facteurs de transcription **TCF-1** et **LEF-1** dans la différenciation en TFh. Ces facteurs se situent en aval de la signalisation canonique de Wnt et sont impliqués dans la différenciation des LT CD4 dans les phases précoces de développement. La génération de TFh ainsi que l'amplitude de la réponse des LB est fortement diminuée dans une souris déficiente en TCF-1 et LEF-1 après infection. Ces deux facteurs, induits par l'activation des voies TCR et CD28, favorisent la réactivité des LT CD4 naïfs aux signaux TFh en favorisant l'expression des chaînes du récepteur à l'IL-6 et en se fixant sur Prdm1 et Bcl-6. Ceci promeut, de façon précoce, la différenciation des LT CD4 en soutenant l'expression de l'IL-6Ra et gp130 (sous-unité de la famille des récepteurs à l'IL-6), en induisant une augmentation de l'expression d'ICOS et en favorisant l'expression de Bcl6 par l'inhibition de Blimp-1<sup>151</sup>.

## Klf2 (Kruppel-like factor 2)

L'activation de CD28 suivie de la répression de Klf2 médiée par ICOS sont nécessaires pour induire et maintenir le phénotype TFh. En effet, Klf2 régule négativement la différenciation en TFh en promouvant l'expression des gènes qui s'opposent au développement des TFh tels que Blimp-1, GATA-3 et T-bet et en réprimant l'expression de CXCR5<sup>152</sup>. De plus, Klf2 va promouvoir l'expression de CCR7, CD62L et S1PR1, impliqués dans le trafic des lymphocytes dans les SLO, et notamment leur sortie à la périphérie<sup>153</sup>.

## FOXO1 (Forkhead box O1) et FOXP1 (Foxhead box protein P1)

Durant les phases précoces de différenciation des TFh, la signalisation d'ICOS va aussi participer à l'activation de la voie PI3K-Akt qui va induire la phosphorylation de **FOXO1** induisant

ainsi sa dégradation<sup>154 155</sup>. Ce facteur agit négativement sur la différenciation en TFh en diminuant notamment l'expression de Bcl-6, CXCR5 et PD-1 en absence des ligands de la signalisation d'ICOS<sup>154</sup>. Il a également été montré l'importance de la suppression de **FOXP1** qui est un facteur de transcription impliqué dans l'inhibition de la différenciation en TFh<sup>156</sup>. Les LT CD4 naïfs déficients en FOXP1 se différencient préférentiellement en TFh par le fait que ce facteur réprime directement la production d'IL-21 ainsi qu'indirectement l'expression d'ICOS et sa signalisation en aval. Le mécanisme par lequel FOXP1 est inhibé dans la différenciation des TFh demeure méconnue mais il semblerait qu'il intervienne précocement puisque son induction est la résultante de la stimulation du TCR.

### **b. Molécules impliquées dans la différenciation des TFh et des LB**

La différenciation des TFh ainsi que celle des LB va impliquer une interaction forte entre ces deux types cellulaires, afin de permettre leur survie et activation mutuelle. L'interaction entre les TFh et les LB va débiter au niveau de la bordure LT:LB, et se poursuivre dans le GC.

#### **SAP (SLAM-associated protein)**

La voie de signalisation induite par SAP, adaptateur protéique intracellulaire se fixant à la queue cytoplasmique des récepteurs de la famille SLAM, permet de stabiliser le contact entre les pré TFh:LB, et de participer à la production d'IL-21 par les pré-TFh<sup>157</sup>. SAP n'est pas nécessaire pour l'adhésion des LT CD4 avec les DC mais intervient dans le contact avec les LB<sup>158</sup>. Chez l'Homme et la souris, SAP est fortement exprimé par les GC TFh comparés aux autres sous-types de LT CD4. L'expression de SAP est importante pour le développement des TFh puisqu'en son absence, les TFh échouent dans l'adhésion avec les LB et ne sont plus retenus dans le GC aboutissant à un défaut d'aide aux LB<sup>158</sup>. Les patients atteints du syndrome lymphoprolifératif lié à l'X, maladie génétique liée à la mutation du gène SH2D1A (codant pour SAP), présentent une anomalie de la réponse humorale, allant d'une altération de la réponse suite à une vaccination jusqu'à l'hypogammaglobulinémie. En outre, des souris déficientes en SAP génèrent une réponse de type IgG après une infection virale, mais ne présentent pas de plasmocytes à longue durée de vie spécifiques du virus, indiquant que SAP n'est pas impliquée dans le développement de la réponse humorale de long terme<sup>65</sup>.

Après activation, les LB vont surexprimer les molécules SLAM-1, SLAM-5 et SLAM-6<sup>159 160</sup>. SLAM-5 et SLAM-6 sont fortement exprimées sur les TFh humains et murins. L'activation de l'axe SAP/SLAM-6 va participer à la formation de la synapse TFh:LB en soutenant la signalisation liée au TCR. Une étude a montré que la délétion de SLAM-5 sur les LB va induire une diminution importante de l'interaction entre TFh:LB qui est essentielle dans l'expansion des LB et la formation du GC<sup>161</sup>. De même, la déplétion de SLAM-6 sur les LT CD4 en association avec une déplétion de SLAM-5 sur les

LB induit une forte diminution de l'interaction. La déplétion de SAP et SLAMF6 sur les TFh est responsable d'une réduction de leur nombre au moment du développement du GC suggérant ainsi un défaut dans les étapes tardives de différenciation ou dans leur survie<sup>161</sup>. Le rôle le plus important de SAP consiste donc en sa liaison avec SLAMF6 afin de prévenir une voie d'inhibition du contact TFh:LB induite par l'interaction entre SLAMF6 et la phosphatase SHP-1<sup>160</sup>. La liaison SAP/SLAMF6 va transmettre des signaux positifs aux TFh en favorisant l'adhésion et la fonction d'aide. En revanche, si SLAMF6 se lie avec SHP-1 (Src Homology 2 domain-containing Phosphatase 1), l'adhésion entre ces deux populations est tronquée<sup>160 162</sup>.

## ICOS/ICOS-L

Les pré-TFh et les LB vont exprimer les molécules de costimulation ICOS et son ligand ICOS-L respectivement. La liaison d'ICOS/ICOSL entre les pré-TFh et les LB va déclencher une série de modifications aboutissant à la diminution de l'expression de CCR7, ainsi que l'augmentation du marqueur CXCR5<sup>163</sup>. Cette interaction est critique pour le maintien du phénotype des TFh puisqu'en absence d'ICOS ou en bloquant son ligand, le nombre de TFh ainsi que la taille des GC sont fortement diminués chez la souris<sup>164 165</sup>. De plus, la délétion d'ICOS-L sur les LB, chez la souris, va induire une diminution de l'expression de CXCR5, d'IL-21 sur les TFh mais également affecter la production d'IgG par les LB<sup>87</sup>. En facilitant le processus de développement des TFh et en favorisant l'interaction prolongée entre les TFh et les LB, la signalisation ICOS/ICOS-L va également faciliter la génération de plasmocytes. Les patients présentant un déficit d'ICOS ont un nombre significativement réduit de LB ayant subi une commutation de classe isotypique sans que cela impacte la génération de LB IgM<sup>+</sup><sup>166</sup>. L'altération de la production de LB à forte affinité et le nombre réduit de LB mémoires générés peut être la résultante, plus généralement, de la perturbation de l'environnement du GC<sup>167</sup>.

## CD40/CD40-L

Le contact entre les GC TFh et les LB va nécessiter l'interaction CD40/CD40-L pour la survie des TFh et des LB. L'interaction ICOS/ICOS-L va favoriser l'augmentation de l'expression de CD40-L sur les GC TFh mais également l'augmentation de celle d'ICOS-L sur les LB. Cette boucle de régulation positive permet aux cellules de maintenir un état activé mais également de renforcer le contact GC TFh:LB<sub>GC</sub>. Cette forte interaction va participer à l'augmentation de la sécrétion d'IL-21 par les GC TFh mais également de BAFF qui vont favoriser la survie des LB<sub>GC</sub>, particulièrement de ceux ayant un BCR de haute affinité. En effet, l'interaction CD40/CD40-L est un signal de survie crucial pour les LB<sub>GC</sub> puisqu'en son absence, il a été observé une dissolution des GC<sup>168</sup>. Chez l'Homme, une mutation du CD40 ou CD40L résulte en une infection bactérienne récurrente et un manque d'IgG, IgA et IgE détecté dans le sérum<sup>169</sup>.

## Fas/Fas-L

Les GC TFh vont être responsables de l'induction de l'apoptose des LB<sub>GC</sub> inappropriée. En effet, au-delà de la sélection positive des LB de forte affinité pour l'antigène, il a été proposé un mécanisme de sélection négative des LB par les TFh faisant intervenir l'interaction Fas/Fas-L. Les GC TFh expriment le Fas-L de façon plus importante que les LT CD4 en périphérie, tandis que les LB<sub>GC</sub> expriment à leur surface le Fas. L'interaction entre Fas/Fas-L est proposée comme pouvant contribuer à la sélection des LB<sub>GC</sub> et l'induction de leur mort par apoptose<sup>170 171</sup>. Il a notamment été montré chez des souris déficientes en Fas fonctionnel dans le compartiment LB, une hyper-prolifération des LT CD4 et LB<sub>GC</sub> ainsi qu'une augmentation du nombre de LB mémoires possédant une accumulation plus importante de mutations somatiques<sup>172</sup>.

## PD-1/PDL-1/PDL-2

Dans la réaction du GC, il est essentiel que les TFh conservent une capacité de détection sensible du CMHII-peptide pour la sélection des LB mais également de limiter la prolifération indésirable des TFh eux-mêmes. La forte expression de PD-1 par les GC TFh contribue à limiter leur prolifération dans les GC en atténuant la signalisation du TCR. En effet, les souris déficientes en PD-1 ont une fréquence plus importante de TFh après immunisation<sup>173</sup>. En revanche, un excès de son ligand, PD-L1 ou PD-L2, exprimé par les LB, entraîne une réduction importante de l'expression d'ICOS et d'IL-21 par les TFh aboutissant à une aide limitée<sup>174</sup>.

## OX40/OX40L

L'état d'activation des LB permet l'expression d'OX40-L à leur surface. L'interaction OX40/OX40-L entre les LB et TFh participe au maintien de l'activation de ces cellules et peut réguler la balance entre LT effecteur et LT mémoire. Chez des souris OX40<sup>-/-</sup>, il y a un défaut d'expression de PD-1 et Bcl-6 par les TFh indiquant l'importance d'OX40 dans la maturation des TFh. Le blocage d'OX40-L à différents temps, après infection, affecte le pool de TFh à des temps précoces et induit également une diminution de l'accumulation des TFh matures dans les GC lors d'un blocage tardif<sup>175</sup>. L'interaction OX40/OX40-L va également participer à la différenciation des LB<sub>GC</sub> en plasmocytes. Lors d'une immunisation d'une souris déficiente en OX40-L, la quantité d'Ig spécifiques est diminuée et la maturation d'affinité des Ig est altérée, suggérant un rôle d'OX40 dans le développement des plasmocytes<sup>176</sup>. L'axe OX40/OX40-L n'est pas impliqué dans l'augmentation du nombre de plasmocytes mais plutôt dans l'augmentation de la sécrétion d'Ig ainsi que dans leur maturation.

## CD40/CD40-L

L'expression de Bcl-6, induite notamment par IRF8<sup>110</sup>, par les LB<sub>GC</sub> va être importante dans la DZ puisque ce FT va contrôler la prolifération des LB dans la DZ en régulant les dommages de l'ADN ainsi que la progression du cycle cellulaire nécessaire lors du processus de SHM<sup>177</sup>. Bcl-6 est également impliqué dans la régulation de l'activation des LB via l'inhibition de gènes STAT ou CD80. Cela permet d'éviter une activation précoce des LB, avant que les processus d'expansion et de SHM ne soient achevés<sup>178 179</sup>. En revanche, l'activation de la signalisation du BCR va induire la phosphorylation de Bcl-6 par la MAPK (mitogen-associated protein kinase) entraînant la dégradation de Bcl-6<sup>180 181</sup>. La diminution de Bcl-6 après chaque cycle de sélection des LB<sub>GC</sub> dans la LZ, est nécessaire à leur différenciation terminale en LB mémoires, pour l'arrêt progressif de leur prolifération, mais également en plasmocytes, initiée par l'induction de Blimp-1<sup>182</sup>. La stimulation du CD40 va inhiber Bcl-6 en induisant l'expression d'IRF4<sup>183</sup>. Dans ce contexte, il a été montré que l'expression d'IRF4 à la place d'IRF8 va permettre l'expression de Blimp-1, inhibiteur de Bcl-6, favorisant la différenciation en plasmocytes<sup>184</sup>. L'inhibition de Bcl-6 va, indirectement, empêcher la diminution d'EBI2 responsable de la localisation des LB<sub>GC</sub> dans le follicule favorisant ainsi la sortie des LB. En effet, l'expression continue de EBI2 est nécessaire pour la migration des plasmablastes en dehors du GC, au niveau des zones extra-folliculaires. Cependant, une partie des LB<sub>GC</sub> doit être capable de ré-augmenter l'expression de Bcl-6 pour réintégrer un cycle cellulaire et accumuler les mutations afin d'assurer la maturation de l'affinité du BCR. Ceci va permettre de maintenir le cycle du GC dans le temps.

### D) Régulation du GC : les LT folliculaires régulateurs

Durant la réaction du GC, la régulation de l'équilibre entre activation et inhibition des TFh ainsi que la prévention de l'émergence de clones de LB auto-réactifs est essentielle. Le contrôle de la réaction du GC est assuré par les LT folliculaires régulateurs (TFr pour « Follicular regulatory T cells ») dont l'activité suppressive va impacter la qualité de la réponse des LB au sein du GC. En effet, tout comme les Treg, les TFr vont exprimer FoxP3, CTLA-4 (cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4), GITR (glucocorticoid-induced TNFR-related protein) et PD-1, mais également des marqueurs des TFh tels que Bcl-6, CXCR5, SAP et ICOS. Contrairement aux TFh, les TFr expriment également Blimp-1 impliqué dans leur activité suppressive. Il a été montré que la population des TFr dérive des nTreg CXCR5- FoxP3+, et que leur expression de Bcl6 et CXCR5 est induite en périphérie. Tout comme les TFh, les TFr ont besoin de l'environnement du GC ainsi que de l'interaction avec des DC pour leur développement, faisant intervenir les voies de signalisation du TCR, du CD28 et d'ICOS<sup>185 186</sup>. En outre, des études ont montré que PD-1 et CTLA-4 sont également impliqués dans la différenciation des TFr. En effet, des souris déficientes en PD1/PD-L1 ont une augmentation des TFr dans les ganglions lymphatiques, avec une plus forte capacité suppressive<sup>187</sup>. L'interaction de PD-1/PD-L1 au sein du GC

va donc réduire leur différenciation et leur fonction régulatrice permettant de réguler la réaction du GC

186

Dans différents modèles murins, l'absence de TFr a abouti à une expansion des TFh et des LB<sub>GC</sub> accompagnée d'une augmentation de la production d'anticorps<sup>188</sup>. De façon plus précise, il a été proposé que les TFr i) favorisent l'émergence de clones de LB sécréteurs d'anticorps de haute affinité en favorisant la compétition des LB<sub>GC</sub> pour obtenir l'aide des GC TFh<sup>189 190</sup>, ii) contrôlent la taille du GC et iii) modulent la commutation de classe et la maturation de l'affinité des anticorps. De plus, les TFr possèdent un répertoire diversifié de TCR, incluant des TCR auto-réactifs, leur permettant de réduire les LB<sub>GC</sub> auto-réactifs et prévenir ainsi le développement de maladies auto-immunes (MAI)<sup>191</sup>.

Comme les Treg, les TFr utilisent des mécanismes de suppression des TFh et LB en régulant à la baisse les molécules de co-stimulation, la production de cytokines et en diminuant physiquement les interactions possibles entre LB<sub>GC</sub> et TFh par leur présence. L'une des principales molécules effectrices régulatrices des TFr est CTLA-4, qui bloque l'interaction entre les molécules CD28 et CD80/CD86<sup>192</sup>. Il a en effet été montré que la délétion de CTLA-4, dans des modèles murins, affecte la différenciation et la fonction des TFh<sup>193 48</sup>. Chez l'Homme, il a été montré que les TFr peuvent réguler la production d'IL-21 par les TFh dans le cadre d'une infection au VIH<sup>194</sup>. Une analyse transcriptomique a mis en évidence que les TFr impactent l'expression des gènes de l'IL-4, IL-21, IL-10 et CD28 mais n'altèrent pas l'expression de Bcl-6 et CXCR5 chez les TFh<sup>195</sup>.

Tout comme les TFh, les TFr du GC peuvent sortir des organes lymphoïdes secondaires, rejoindre la circulation sanguine, à la fois chez la souris et l'Homme, et développer un phénotype de type mémoire.

## II. Les TFh mémoires

Une fois différenciés et leur rôle d'aide effectué, les GC TFh peuvent sortir du GC pour aller dans un autre GC, y transiter temporairement avant de revenir dans leur GC initial, ou réguler à la baisse Bcl-6 pour devenir un TFh mémoire.

### A) Découverte des TFh mémoires

La caractérisation des TFh mémoires a été initiée, chez la souris, par la découverte d'une population de LT CD4 CXCR5+ICOS+ persistante au niveau des nœuds lymphatiques drainants jusqu'à 200 jours après vaccination avec du cytochrome c de pigeon combiné à un adjuvant. Dans cette étude, les auteurs ont montré que les LT CD4 CXCR5+ICOS+ possèdent une expression diminuée de OX40

et ICOS comparés aux TFh effecteurs à jour 7 post-immunisation<sup>196</sup>. Une autre étude a identifié une accélération de la réponse LB avec commutation de classe en présence de LT CD4 mémoires, spécifiques de l'antigène et exprimant CXCR5<sup>197</sup>. D'autres travaux ont par la suite confirmé la persistance de ces TFh dans le temps, en absence d'antigène, et leur capacité à réacquérir un phénotype de GC TFh après une seconde immunisation en réexprimant rapidement Bcl-6<sup>198 199 197</sup>. De même, une étude utilisant un modèle d'infection aiguë avec le LCMV (virus de la chorioméningite lymphocytaire), où l'on transfère ensuite les LT CD4 transgéniques SMARTA, montre que des TFh mémoires SMARTA spécifiques de l'antigène persistent 60 à 150 jours après infection<sup>200</sup>. Le transfert adoptif des populations SMARTA CXCR5+, après infection avec le LCMV, induit des TFh effecteurs secondaires capables de promouvoir la différenciation des LB<sub>GC</sub>. Les études de transferts adoptifs, chez la souris, ont pu mettre en évidence la présence des TFh mémoires et leur capacité à se différencier préférentiellement en TFh effecteurs après restimulation antigénique.

Chez l'Homme, des TFh identifiés dans la circulation sanguine (CD4<sup>+</sup>, CXCR5<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>) ont été caractérisés comme étant le compartiment mémoire des TFh. En effet, une étude a révélé la présence, 2 à 4 ans après immunisation, de LT CD4 CXCR5+ spécifiques de la toxine du tétanos (TT) dans le sang périphérique<sup>201</sup>. De même, des LT CD4 CXCR5+ mémoires spécifiques de la variole ont été retrouvés dans le sang d'individus sains des dizaines d'années après vaccination. L'ensemble de ces données montre que les LT CD4 CXCR5+ mémoires peuvent se maintenir durant de nombreuses années sans restimulation. Il est à noter que la persistance de ces LT CD4 CXCR5+ mémoires, dans le sang, diffère selon les vaccins, la stimulation antigénique et/ou l'antigène et pourrait dépendre de la stimulation initiale reçue lors de la différenciation en TFh.

Des preuves ont pu être apportées concernant le lien entre les LT CD4 CXCR5+ circulants et la lignée des TFh dans les organes lymphoïdes sur les patients atteints d'immunodéficience primaire. La déficience en CD40-L, ICOS ou STAT3 entraîne un défaut important de la formation des GC mais également une diminution de la population de LT CD4 CXCR5+ en périphérie<sup>164 202 90</sup> mettant ainsi en lumière une relation entre les deux compartiments. Dans le cas de la déficience en ICOS, la perte des LT CD4 CXCR5+ mémoire est sélective car la fréquence des LT CD4 totaux ne semble pas être altérée suggérant que les LT CD4 CXCR5+ mémoires du sang sont passés par le GC<sup>164</sup>. Cependant, à la fois chez des sujets et des modèles murins déficients en SAP, une altération dans la génération de TFh matures a été observée mais cela ne s'accompagne pas d'une modification du compartiment des TFh mémoires<sup>94 203</sup>. SAP n'est pas nécessaire durant les phases précoces de développement mais plutôt dans les phases terminales de différenciation des TFh effecteurs. Ces données suggèrent que les LT CD4 CXCR5+ du sang périphérique sont générés à partir de cellules provenant de la lignée TFh mais pas exclusivement à partir de GC TFh ayant complété leur différenciation.



## B) Caractérisation des TFh mémoires

### a. Caractérisation phénotypique

Les TFh mémoires circulants (cTFh mémoires) n'expriment pas Bcl-6 ce qui indique que le maintien de son expression n'est pas indispensable au maintien de l'expression de CXCR5, ICOS, SAP, CD40-L et CXCL13<sup>204 133</sup>. En revanche, un faible niveau de Maf a été trouvé dans les cTFh mémoires humains (CXCR5+CXCR3-PD-1+) qui pourrait être impliqué dans le maintien du phénotype TFh. Tout comme Ascl2 dont l'expression est maintenue dans chez les cTFh mémoires et qui pourrait permettre l'expression de CXCR5<sup>149</sup>. Les mécanismes gouvernant le maintien du phénotype et l'expression de CXCR5 par les cTFh mémoires restent encore à explorer. L'état épigénétique des cTFh mémoires pourrait également faciliter leur réactivation lors d'une nouvelle rencontre avec l'antigène<sup>200</sup>.

Les marqueurs d'activation ICOS, OX40, IL-7R et CD69 tout comme PD-1 se trouvent fortement diminués dans la majorité des TFh mémoires circulants par rapport au GC TFh, reflétant un état quiescent de ces cellules comparées aux GC TFh fortement stimulés par les DC ou les LB. La majorité des cTFh mémoires exprime CCR7 et CD62L contrairement aux GC TFh. L'expression de CCR7 et CD62L, dont les ligands sont fortement présents au niveau des HEV (high endothelial venules) des organes lymphoïdes secondaires, va permettre aux cTFh mémoires de pouvoir plus facilement circuler et patrouiller dans ces derniers. L'expression de CXCR5 semble être une propriété intrinsèque à ces cellules et permet aux cTFh mémoires de migrer préférentiellement à la frontière LT:LB au niveau de la rate ou des ganglions lymphatiques.

Toutefois, il existe une faible proportion de cTFh mémoire exprimant faiblement CCR7 et co-exprimant ICOS et PD-1 à un haut niveau (ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>++</sup>)<sup>205 203 206</sup> et une population exprimant à un faible niveau PD-1 mais pas ICOS et faiblement CCR7 (ICOS<sup>-</sup>PD-1<sup>low</sup>CCR7<sup>int</sup>). Les niveaux d'expression différents d'ICOS, PD-1 et CCR7 reflètent un niveau différentiel d'activation : les cTFh mémoires ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>++</sup>CCR7<sup>lo</sup> étant dans un état activé, les cTFh mémoires ICOS<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup>CCR7<sup>hi</sup> et ICOS<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>CCR7<sup>int</sup> étant dans un état de quiescence.

C'est lors d'une restimulation antigénique que les cTFh mémoires vont acquérir les fonctions classiques des GC TFh à la fois *in vivo* et *in vitro*. Les LB mémoires vont participer à la présentation antigénique aux cTFh mémoires ce qui va notamment induire l'expression de Bcl-6 dans ces derniers<sup>199 207</sup>. Après re-stimulation, les cTFh mémoires ont donc la capacité de se localiser rapidement à la bordure LT:LB, permettant de renforcer leur phénotype par cette interaction, puis dans le GC afin de soutenir la réponse des LB. L'activation des cTFh mémoires va donner lieu à une augmentation de l'expression d'ICOS, Bcl-6 et CD69 mais également à la production de nombreuses cytokines dont l'IL-21<sup>208 209</sup>. La réexpression des principaux facteurs de transcription, ainsi que l'état épigénétique des gènes liés au

développement et à la fonction des TFh jouent un rôle important dans la réactivation des TFh mémoires en TFh effecteurs secondaires.

## **b. Caractérisation fonctionnelle**

A la fois chez l'Homme et la souris, les cTFh mémoires ont été principalement caractérisés par leur durée de vie, leur aptitude à aider les LB et à générer une réponse humorale sur le long terme. Chez l'Homme, les LT CD4 CXCR5<sup>+</sup> mémoires circulants possèdent des caractéristiques fonctionnelles similaires aux TFh puisqu'ils sont capables de promouvoir, *in vitro*, le changement de classe des Ig et induire la production d'IgG, IgA et IgE en co-culture avec des LB<sup>209</sup>. A la fois dans des co-cultures de type allogénique (les LB ne proviennent pas du même donneur) et autologue (même donneur entre les cTFh mémoires et les LB) et après stimulation avec un super-antigène, les LT CD4 CXCR5<sup>+</sup> mémoires induisent une différenciation en plasmocytes plus importante ainsi qu'une plus forte sécrétion d'Ig comparés aux LT CD4 CXCR5<sup>-</sup> mémoires. De même, les LT CD4 CXCR5<sup>+</sup> sont également plus efficaces que les LT CD4 CXCR5<sup>-</sup> à induire une production d'Ig par des LB mémoires<sup>209</sup>.

Après une stimulation du CD3 et d'ICOS-L *in vitro*, il s'avère que les CXCR5<sup>+</sup> mémoires ont une expression plus importante d'IL-10, associée à une meilleure aide aux LB, et d'IL-17 comparés aux CXCR5<sup>-</sup>. Avec une stimulation du CD3/CD28, les CXCR5<sup>+</sup> expriment davantage d'IL-21 comparés aux CXCR5<sup>-</sup> mémoires. Ces résultats permettent d'identifier un profil cytokinique différent entre les deux populations mais révèlent également l'importance du type de stimulation utilisée. De manière similaire avec les GC TFh, les LT CD4 CXCR5<sup>+</sup> du sang sécrètent de l'IL-21 après contact avec des LB naïfs contrairement aux LT CD4 CXCR5<sup>-</sup> du sang. Les études précédentes menées sur les GC TFh ont pu montrer l'implication de l'IL-21 dans l'expansion et la différenciation des LB en plasmocytes. Concernant les LT CD4 CXCR5<sup>+</sup> mémoires du sang, il a été observé une diminution dose-dépendante de la sécrétion d'Ig lors du blocage de l'IL-21 dans la co-culture avec des LB naïfs. Cette aide est dépendante également de l'axe ICOS/ICOS-L puisque le blocage de cette interaction inhibe la sécrétion d'IL-21 par les TFh mémoires du sang et la sécrétion d'Ig par les LB. L'induction de la différenciation des LB en plasmocytes avec des LT CD4 CXCR5<sup>+</sup> est observée en présence d'un super-antigène ce qui appuie l'importance du contact pour initier une réponse.

## **C) Les sous-types de TFh mémoires circulants**

### **a. Les populations de cTFh1, cTFh2, cTFh17 et cTFh1/17**

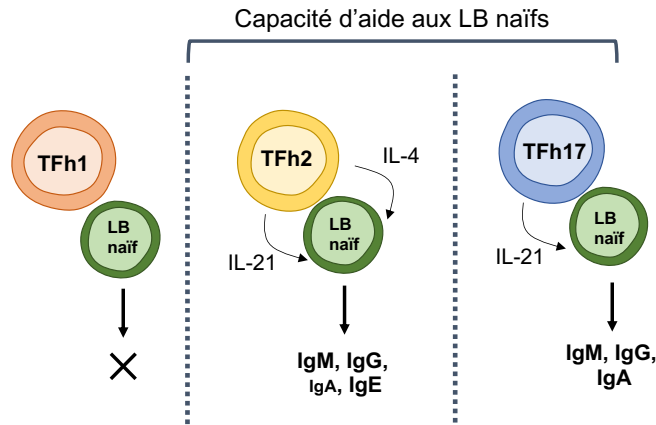
A l'image des sous-type de LT CD4, il existe une grande hétérogénéité parmi les LT CD4 CXCR5<sup>+</sup> mémoires qui sont défini selon leur expression de CCR6 et CXCR3 : les **cTFh1** ou Th1-like

(CXCR3+CCR6-), **cTFh17** ou Th17-like (CXCR3-CCR6+), **cTFh2** ou Th2-like (CXCR3-CCR6-) et les **cTFh1/17** ou Th1/17-like (CXCR3+CCR6+)<sup>209</sup>.

Il a été montré que les cTFh1 sont capables de sécréter de l'IFN $\gamma$  mais pas les cytokines de type Th2 ou Th17. De même, les cTFh2 sécrètent de l'IL-4, IL-5 et IL-13 qui sont apparentées aux Th2. Les cTFh17 sécrètent de l'IL-17A et de l'IL-22 tout comme les Th17. Les similitudes se poursuivent avec l'expression des facteurs de transcription spécifiques de chaque lignée : T-bet, GATA3 et ROR $\gamma$ t pour les cTFh1, cTFh2 et cTFh17 respectivement.

Chez l'Homme, en condition de co-culture avec les LB mémoires et naïfs, il a été montré que les LT CD4 CXCR5+ (cTFh mémoires) fournissent une aide plus importante comparés aux LT CD4 CXCR5- mémoires. En cultivant les cTFh1, cTFh2 et cTFh17 avec des LB naïfs en présence de super-antigène, Morita et al ont pu mettre en évidence une capacité différentielle d'aide aux LB<sup>209</sup>. En effet, après 12 jours de co-culture, seuls les cTFh2 et cTFh17 sont capables d'induire la différenciation et la production d'Ig par les LB initialement naïfs. Les cTFh2 induisent la sécrétion d'IgM, IgG, IgA et IgE, tandis que les Th2 (CXCR5-) sont seulement capables d'induire la sécrétion d'IgM et peu d'IgE. Les cTFh17 vont, quant à eux, être responsables de la sécrétion d'IgM, IgG et IgA par les LB. Concernant les cTFh1, ils n'ont aucune aptitude pour induire la différenciation et la sécrétion d'Ig notamment due à leur faible capacité à promouvoir la survie des LB naïfs (**Figure 9**). En accord avec ces données, il a été montré que les cTFh2 et cTFh17 sécrètent de l'IL-21 contrairement aux cTFh1. Le blocage de l'IL-21 dans ces cultures inhibe la production d'Ig par les LB en co-culture avec les cTFh2 et les cTFh17. Le blocage de l'IL-4 dans la culture des cTFh2 inhibe, quant à lui, la production d'IgE. Les cTFh1/17 sont actuellement très peu décrits d'un point de vue fonctionnel. Les cTFh sont donc divisés en deux sous-groupes, les cTFh2 et cTFh17 assurant une aide efficace aux LB naïfs et les cTFh1 n'ayant pas cette capacité.

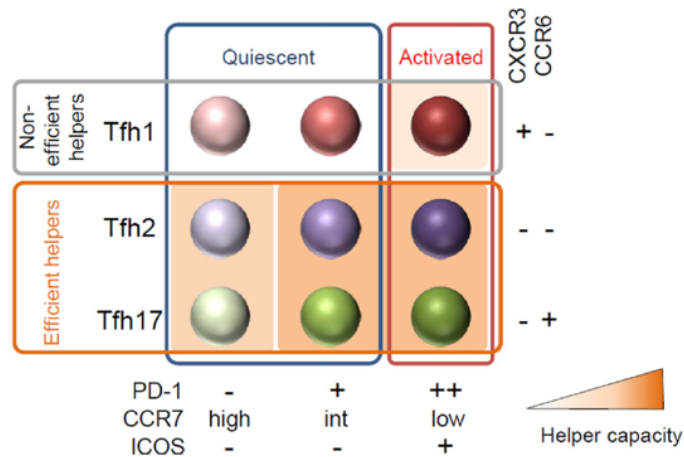
Toutefois, des travaux ont pu mettre en évidence que la population de cTFh1 PD-1<sup>++</sup>ICOS<sup>+</sup> est capable de produire de l'IL-21, et en quantité suffisante pour pouvoir induire la différenciation des LB mémoires mais pas des LB naïfs<sup>205</sup>. En effet, suite à la vaccination contre le virus de la grippe, Bentebidel et al ont montré une augmentation de l'expression d'ICOS par les cTFh1<sup>205</sup>. L'apparition de cette population de LT CD4+CXCR5+CXCR3+PD-1<sup>++</sup>ICOS<sup>+</sup> corrèle avec le développement de plasmablastes et plus largement avec la réponse humorale mise en place. Le rôle des cTFh1 reste donc encore à préciser chez l'Homme notamment en situation pathologique.



**Figure 9: Différentes capacités d'aide aux LB naïfs des sous-types de TFh mémoires inspiré de Morita et al.**

Illustration de la capacité d'aide aux LB fournis par les cTFh1 (CXCR3+CCR6-), cTFh2 (CXCR3-CCR6-) et cTFh17 (CXCR3-CCR6+) isolés à partir de sang de donneurs sains et co-cultivés avec des LB naïfs et un super antigène (Staphylococcal enterotoxin B).

Parmi les sous-types de cTFh, l'expression différentielle d'ICOS et PD-1 va définir trois populations : les cellules activées (ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>++</sup>) et les cellules quiescentes (ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>-</sup> et ICOS<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup>). De façon attendue, les cTFh2 et cTFh17 ICOS<sup>+</sup>PD-1<sup>++</sup> représentent les populations les plus efficaces dans l'induction de la différenciation des LB, suivies des ICOS<sup>-</sup>PD-1<sup>+</sup> qui fournissent une aide plus importante aux LB mémoires que les ICOS<sup>-</sup>PD-1<sup>-</sup> <sup>164 210</sup>(**Figure 10**).



**Figure 10 : Capacité d'aide aux LB de chaque sous type de cTFh mémoires d'après Schmitt et al, 2014.**

L'expression de CXCR3 et CCR6 va permettre de séparer les sous-types de cTFh mémoires. Le niveau d'expression d'ICOS, PD1 et CCR7 va refléter un niveau d'activité de ces populations.

## **b. Les TFr circulants (cTFr)**

Des TFr ont également été retrouvés dans la circulation sanguine et présentent des propriétés de cellules mémoires qui les rapprochent de leurs homologues présents dans les GC des ganglions lymphatiques secondaires en termes de phénotype et fonction. En effet, il a été montré que les TFr mémoires circulants (CD4+CD25+ICOS+CXCR5+FOXP3+Bcl-6-) sont capables de se maintenir au cours du temps et d'être réactivés par un antigène *in vivo*. Tout comme les TFr du GC, les cTFr vont être responsables de l'inhibition de l'activation des TFh, des LB et de la commutation de classe des LB. Les cTFr peuvent se relocaliser au niveau des GC après une deuxième exposition antigénique.

Comparés aux TFr des GC, les cTFr expriment un niveau similaire de CXCR5 mais plus faiblement ICOS, témoignant d'un état moins activé<sup>211</sup>. L'expression de Bcl-6 et PD-1 par les cTFr n'est pas suffisante pour permettre de les distinguer des Treg conventionnels (CXCR5-)<sup>212</sup>. Il semblerait que les cTFr (CXCR5+FoxP3+) soient générés après les étapes initiales de la formation du GC, avant la différenciation complète en TFr résidant dans le GC. Il est à noter que, selon les études, plusieurs stratégies sont utilisées pour identifier les cTFr prenant en compte partiellement ou en totalité l'expression des marqueurs CXCR5, FoxP3, PD-1 et/ou CD25 (associée ou non à la faible expression de CD127).

De nombreuses études utilisent le ratio TFr/TFh comme indicateur de la réaction des GC dans les maladies auto-immunes. Le ratio des TFr sur les TFh en faveur des TFr va suggérer une fonction ralentie du GC et notamment une génération moins importante de plasmocytes. Même si ce ratio reflète une réalité partiellement biaisée, il n'en reste pas moins utile pour évaluer la réponse dépendante des LB notamment en raison de l'accès limité aux organes lymphoïdes secondaires chez l'Homme.

## **D) Plasticité entre les cTFh et les autres sous-types de LT effecteurs**

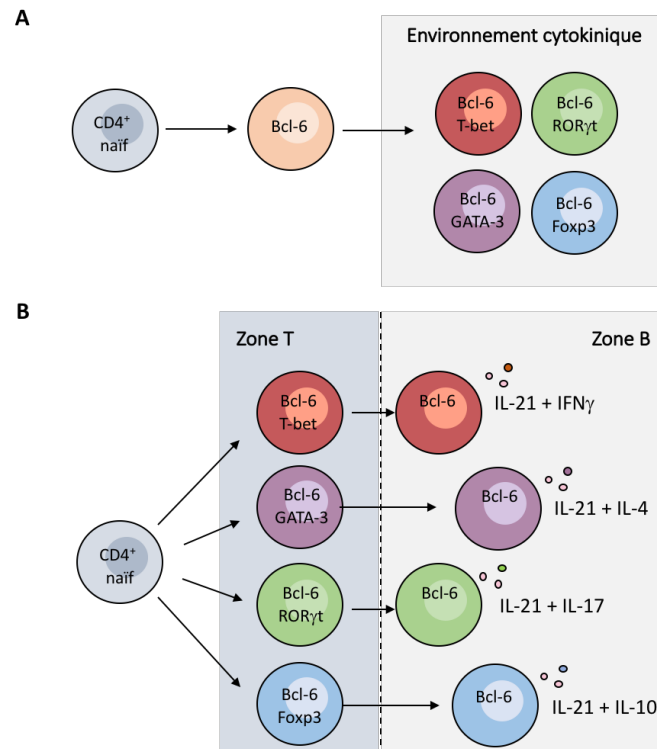
Il existe une certaine plasticité dans le développement des cTFh, à la fois au niveau du processus de différenciation mais également dans la possibilité de changement phénotypique des TFh (et des autres LT effecteurs). En effet, il a été montré que d'autres lignages de LT CD4 effecteurs peuvent, dans un contexte particulier d'inflammation, acquérir le phénotype et/ou la fonction de TFh chez la souris<sup>213 214</sup>. Dans un modèle de transfert adoptif de Treg Foxp3<sup>+</sup>, dans des souris dépourvues de LT (CD3ε<sup>-/-</sup>), il a été observé que ces cellules acquièrent un phénotype de TFh dans les plaques de Peyer mais pas dans la rate. Cette différenciation est associée à une diminution du Foxp3 et d'une augmentation de Bcl-6, de CXCR5 et d'IL-21<sup>215</sup>. En outre, des travaux ont montré que des Th17, générés à partir de LT CD4 naïfs humains, *in vitro*, présentent de multiples marqueurs des TFh tels que ICOS, Bcl-6, PD-1, IL-21 et CXCR5<sup>89</sup>. En outre, il a été montré, *in vivo*, que les LT sécrétant l'IL-4 peuvent acquérir un phénotype

de TFh après interaction avec les LB<sup>213</sup>. De même, *in vitro*, les Th1 ou Th2 peuvent se transformer en cellules ressemblant au TFh (« TFh-like ») productrices d'IFN $\gamma$  ou d'IL-4<sup>216</sup>. Cependant, la relation entre les Th1 et les TFh producteurs d'IFN $\gamma$ , ainsi que des Th2 et des TFh producteurs d'IL-4, reste toujours à éclaircir.

D'autres études ont révélé qu'après transfert de LT CD4 CXCR5+ et restimulation antigénique, cette population mémoire est capable de générer des LT effecteurs secondaires non TFh<sup>217</sup>. Ces études montrent qu'il existe une certaine plasticité dans le devenir des LT CD4 CXCR5+ après restimulation antigénique même si l'ensemble des données suggère une polarisation au moins préférentielle en TFh effecteurs. Cette caractéristique peut permettre aux TFh de conserver des propriétés d'autres LT CD4 effecteurs selon la nature de l'antigène rencontré et contribuer ainsi à une immunité protectrice. En effet, les TFh ont la capacité de sécréter des cytokines caractéristiques des autres sous-type de LT CD4 telles que l'IL-4 pour les Th2, l'IL-17 pour les Th17, l'IFN $\gamma$  pour les Th1 et l'IL-10 pour les Treg. D'autre part, la présence de TFh Bcl-6<sup>+</sup> exprimant des facteurs de transcription spécifiques d'autres lignées comme ROR $\gamma$ t, GATA3 ou T-bet a mis en évidence une certaine flexibilité dans le processus de différenciation des LT CD4 ou dans leur adaptabilité à leur environnement. En effet, chez l'Homme, des TFh co-exprimant Bcl-6 et ROR $\gamma$ t ont été retrouvés dans les centres germinatifs des amygdales suggérant que le processus de différenciation doit être partagé, en partie, par les Th1 et Th17<sup>89</sup>. De plus, des données récentes menées sur la souris ont montré, après une infection virale, une co-expression de T-bet et Bcl-6 au sein d'une population de TFh<sup>218 219</sup>. Cette co-expression est associée à une augmentation de STAT4 et aboutit à une régulation de la production d'IL-21 et d'IFN- $\gamma$  par les TFh permettant ainsi une adaptation de la réponse GC dépendante<sup>91</sup>.

Plusieurs modèles ont été développés pour expliquer l'origine de ces cTFh ayant des caractéristiques de Th1, Th2 ou Th17 et qu'à l'inverse, les cTFh mémoires soient capables de se différencier en non-TFh. L'une des hypothèses conçoit une très grande plasticité des cTFh mémoires qui dériveraient des GC TFh exprimant déjà le CXCR3, pour les TFh1 par exemple, ou de pré-TFh ayant été exposés à un environnement orienté Th1<sup>220</sup>. Une fois réactivés, les cTFh mémoires peuvent ainsi se différencier en TFh, en TFh1 ou en Th1. Cette plasticité a déjà été observée chez la souris mais reste encore peu décrite chez l'Homme. Pour expliquer la co-expression de FT par les TFh, Fang et Zhu<sup>221</sup> ont proposé un modèle selon lequel l'expression d'autres FT par les TFh soit modulée en fonction de l'environnement cytokinique déterminant quel type de FT sera co-exprimés (**Figure 11A**). Ils ont également proposé que les cytokines sécrétées par les TFh soient la résultante de l'expression transitoire et précoce d'autres facteurs de transcription (T-bet, GATA3, ROR $\gamma$ t) par les TFh permettant de préparer le locus de la cytokine d'intérêt à son expression ultérieure (IFN $\gamma$  pour l'expression de T-bet par exemple) (**Figure 11B**). Une fois le locus en conformation ouverte, l'expression du facteur de

transcription canonique n'est plus nécessaire pour la production de la cytokine correspondante par les TFh<sup>221</sup>. L'ensemble de ces données révèle une plasticité dans le processus de différenciation, l'engagement vers un sous-type de LT CD4 ne signifie pas nécessairement que le LT conservera ce phénotype.



**Figure 11 : Modèle inspiré de Fang et Zhu sur le développement des TFh sécréteurs de cytokines effectrices.**

(A) La capacité des TFh à produire de l'IFN $\gamma$  ou de l'IL-4 apparaît après leur développement. Les facteurs de transcription sont faiblement exprimés et orientent la sécrétion des TFh.

(B) L'expression transitoire de GATA3, T-bet, ROR $\gamma$ t ou Foxp3 au stade précoce de développement conditionne les TFh vers la sécrétion d'IL-4, IFN $\gamma$ , IL-17 ou IL-10 au sein du follicule B.

### III. TFh dans les pathologies : exemple des maladies auto-immunes (MAI)

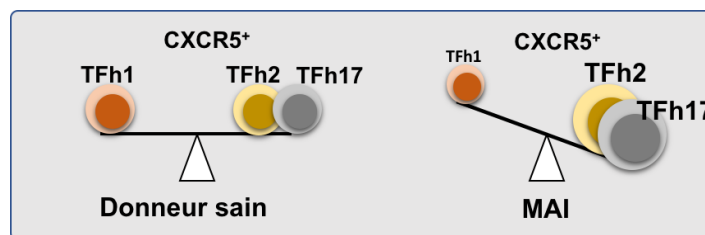
Le développement de maladies auto-immunes est consécutif à une anomalie du système immunitaire conduisant à la rupture de la tolérance du soi. De nombreuses études sur les MAI ont corrélé la présence de cTFh avec le score de la maladie et/ou la présence d'auto-anticorps dans le sérum. Il est possible de distinguer trois catégories de MAI : celles qui sont médiées par des auto-anticorps, celles qui sont associées à des auto-anticorps mais dont la causalité n'a pas été clairement établie et celles non associées à des auto-anticorps<sup>222</sup>. Dans cette partie, nous verrons quelques exemples de MAI pour illustrer l'implication des TFh. L'éventail de pathologies dans lesquelles les TFh sont ou pourraient être impliqués est très vaste, allant des maladies infectieuses au cancer (du sein et colorectal par exemple), en passant par les maladies auto-immunes non présentées ici telles que le diabète de type 1, la

vascularite, la sclérodémie systémique etc. Le but de cette partie n'est pas d'aborder dans le détail l'ensemble de ces aspects mais plutôt de mettre en évidence le champ des possibles concernant l'étude des TFh dans certaines MAI.

### A) Ratio des sous-types de cTFh dans les MAI

L'étude de la contribution des TFh dans les MAI s'est effectuée initialement dans des modèles animaux du fait de la difficulté à explorer le rôle des TFh dans les SLO chez l'Homme. La découverte des TFh circulants, plus accessible chez l'Homme, a permis d'analyser ces cellules dans le contexte de MAI, qui constituent un outil très utilisé de nos jours.

Pour évaluer l'altération des TFh, de nombreux travaux se basent sur le ratio cTFh2 et cTFh17, qui sont considérés comme étant efficaces dans l'aide aux LB, sur les cTFh1, considérés comme peu voire pas efficaces dans cette fonction (**Figure 12**). Dans de multiples MAI, le ratio est altéré en faveur des phénotypes aidants des cTFh comparés aux donneurs sains et est fortement corrélé avec la fréquence de plasmablastes circulants et/ou le score clinique de la pathologie étudiée. Les sous-types des cTFh peuvent donc être un biomarqueur intéressant pour évaluer la dérégulation de la réponse des LB dans les MAI.



**Figure 12 : Schéma de Morita et al, 2011<sup>209</sup> illustrant le ratio (cTFh1+cTFh2)/cTFh1 chez les donneurs sains et les patients atteints de MAI.**

### B) Les structures lymphoïdes ectopiques (ELS) dans les MAI

Dans certaines conditions, Les LT et LB vont infiltrer les tissus où se déroule l'inflammation et former des ELS. Ces structures ressemblent anatomiquement et fonctionnellement aux GC des SLO, les ELS sont caractérisées par la formation d'agrégat de LT et LB accompagné d'un réseau de FDC. Les ELS favorisent le processus de maturation de l'affinité du BCR, la sélection des LB auto-réactifs et leur différenciation en plasmocytes<sup>223</sup>. Les chimiokines CCL19, CCL21, CXCL12 et CXCL13 sont essentielles à la localisation des cellules immunitaires au niveau des ELS.

Les structures lymphoïdes ectopiques apparaissent dans les organes cibles des patients atteints de maladies auto-immunes qui représentent un site d'inflammation chronique, comme les reins dans le



lupus érythémateux systémique (SLE)<sup>224</sup>, les glandes salivaires dans le syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS)<sup>225</sup>, dans le tissu synovial dans l'arthrite rhumatoïde (RA)<sup>223</sup>, dans la thyroïde chez les patients atteints de thyroïdite d'Hashimoto et dans les méninges des patients atteints de la sclérose en plaques (SEP)<sup>226</sup>. La présence de ces ELS va être très variable en fonction des pathologies, allant d'une minorité de patients SLE (dans les lésions des lupus néphrétique), d'environ 40% des patients atteints de RA à 100% des patients ayant une thyroïdite.

Du fait de leur fonction, il est proposé que les TFh aident à développer et/ou à soutenir les ELS qui représentent un site de recrutement des cellules immunitaires qui s'engage ensuite activement dans la pathologie. De même, les TFh pourraient soutenir la production d'auto-anticorps par les LB. Chez la souris, il a été montré que l'expression ectopique de CXCL13 induit la formation d'ELS et le recrutement des LB dans les tissus non lymphoïdes<sup>227</sup>, suggérant que les TFh puissent également être attirés par le gradient de CXCL13. Cependant, le lien direct entre les ELS et les TFh restent encore peu connue. Chez la souris, les ELS dans les modèles de MAI restent compliquées à étudier notamment à cause de la difficulté à générer des modèles reproduisant ces structures. Toutefois, l'implication des TFh dans l'établissement des ELS est soutenue par le fait que la production de CXCL13 par les LT CD4 est décelée dans les ELS des articulations des patients RA<sup>228</sup>. Chez l'Homme, les TFh restent des producteurs importants de CXCL13<sup>229</sup> et donc peuvent représenter un candidat essentiel à la formation de ces structures. De récentes études ont également révélé l'implication des Tph (pathogenic T peripheral helper cells), qui sont décrits comme des « TFh-like » n'exprimant pas CXCR5 mais capables de produire de l'IL-21 et de se localiser dans les sites inflammatoires, dans l'établissement de ces ELS. Tout comme les TFh, les Tph sont capables d'induire la différenciation des LB lorsqu'on les isole à partir de tissus inflammatoires. Dans le SGS, l'expansion des populations circulantes de Tph (CXCR5<sup>-</sup>PD1<sup>hi</sup>ICOS<sup>+</sup>) et de TFh (CXCR5<sup>+</sup>PD-1<sup>+</sup>ICOS<sup>+</sup>) permet d'identifier les patients SGS avec ELS<sup>230</sup>. Les TFh et/ou les Tph sont donc des candidats intéressants dans la formation des ELS mais davantage de travaux sont nécessaires pour déterminer leur réelle implication.

### C) Exemples du rôle des TFh dans les maladies auto-immunes

#### Lupus érythémateux systémique (SLE)

Le rôle des auto-anticorps a été largement décrit dans le SLE, et ceux-ci sont produits par les LB possédant des mutations somatiques indiquant leur provenance du GC<sup>231</sup>. Chez l'Homme, la fréquence des cTFh avec un phénotype activé (PD-1+ICOS+) est augmentée chez les patients SLE comparés aux donneurs sains et est corrélée avec le nombre de plasmablastes circulants et le niveau d'auto-anticorps<sup>232 233</sup>. De plus, il a été observé une altération dans la répartition des sous-types de cTFh avec un ratio cTFh2 et cTFh17 par rapport aux cTFh1 en faveur des sous-types aidants les LB<sup>234</sup>. Ce

ratio est corrélé avec l'activité de la maladie. Enfin, un niveau plus élevé d'IL-21 a été dosé dans le plasma des patients SLE comparés aux donneurs sains<sup>235 236 237</sup>. Cette forte concentration d'IL-21 dans le sang est également corrélée à la gravité de la maladie et aux nombres de TFh. L'ensemble de ces données suggèrent une implication des TFh dans le développement du lupus et constituent une piste sérieuse pour de nouvelles stratégies thérapeutiques.

### **Maladies inflammatoires de l'intestin (IBD)**

Chez les patients atteints d'IBD, comprenant la maladie de Crohn (CD) et la colite ulcéreuse (UC), la fréquence de cTFh est supérieure à celle retrouvée chez les donneurs sains<sup>238 239</sup>, et est spécifiquement liée à l'augmentation des cTFh1 et cTFh17 et la réduction des cTfr (ratio Tfr/TFh en faveur des TFh). Tout comme pour le lupus, le niveau de cTFh est corrélé avec la gravité de la maladie. Il s'est avéré que les patients qui développent un cancer colorectal, considéré comme symptôme aggravant suite à l'IBD, présentent une augmentation significative de cTFh par rapport à ceux qui n'en développent pas<sup>239</sup>. En outre, le niveau d'IL-21 dans le sérum des patients est augmenté par rapport aux donneurs sains. Ce niveau d'IL-21 est encore plus important dans les tissus du côlon des patients atteints d'UC<sup>240</sup>. Ces données suggèrent que les TFh sont impliqués dans la physiopathologie de l'IBD ou participent tout du moins à l'évolution de la gravité de maladie.

### **Syndrome de Gougerot-Sjögren (SGS)**

Le SGS est associé à une infiltration lymphocytaire des glandes salivaires et lacrymales principalement. Le pourcentage de cTFh, particulièrement les cTFh17, est augmenté chez les patients avec de sévères manifestations de la maladie<sup>241 240</sup>. En outre, 30 à 40% des patients développent des ELS au niveau des glandes salivaires, augmentant significativement le risque de développer un lymphome B<sup>242 243</sup>. En outre, il a été montré une augmentation du ratio Tfr/TFh dans le sang des patients SGS, en faveur d'une augmentation des Tfr, comparés aux donneurs sains. L'augmentation de ce ratio est associée à l'infiltration lymphocytaire dans les glandes salivaires, et corrèle avec la présence d'ELS dans les glandes exocrines des patients SGS. De plus, la fréquence des TFh activés (PD1+ICOS+) est associée à l'activité de la maladie<sup>244</sup>.

### **Sclérose en plaques (SEP)**

Durant ma thèse, je me suis particulièrement intéressée à la SEP, dans laquelle le rôle des TFh, entre autres, est encore mal connu, en particulier dans les phases plus tardives de la maladie. Nous verrons en détails la physiopathologie de la SEP dans le chapitre suivant.

## Chapitre 3 : La sclérose en plaques (SEP)

### I. Physiopathologie de la SEP

#### A) Découverte de la SEP

La SEP a été définie pour la première fois en 1870 par Jean Martin Charcot et Alfred Vulpian qui ont décrit la maladie d'un point de vue anatomique et clinique. A l'issue de nombreuses observations sur des patients durant le début du XIX<sup>ème</sup> siècle, ils ont pu en caractériser les symptômes tels que des troubles de l'allocution, du mouvement oculaire, des tremblements et la présence de « plaques » au niveau des fibres nerveuses du système nerveux central (SNC). Ils ont ainsi nommé cette maladie, la sclérose en plaques, du fait de l'observation caractéristique de ces manifestations sclérotiques. Charcot a décrit trois formes de la maladie en tenant compte de la localisation des lésions : les formes céphaliques, rachidiennes et cérébro-rachidiennes<sup>245</sup>. L'ensemble des observations a permis d'apporter des connaissances sur la maladie, tout en mettant déjà en lumière sa complexité et sa diversité.

Les premières hypothèses sur l'origine de la SEP apparaissent rapidement après sa découverte, avec notamment une théorie prédominante, à l'époque, d'une cause infectieuse (bactéries ou virus) à l'origine de l'inflammation du SNC. D'autres théories ont vu le jour les années qui ont suivies, sur une potentielle origine vasculaire, supposant alors que la maladie était déclenchée par des facteurs circulants<sup>246</sup>. L'observation au microscope des cellules nerveuses a permis à James Dawson de constater la présence de dommages sur la myéline des patients SEP. C'est vers 1960, avec les progrès de la recherche concernant l'immunologie, que la SEP a été caractérisée comme étant une maladie auto-immune, résultant d'un dysfonctionnement du système immunitaire qui « s'attaque » à la gaine de myéline des neurones. Le développement des technologies d'imagerie, tel que l'imagerie par résonance magnétique (IRM) dans les années 80, a permis une meilleure compréhension de la maladie et la mise en place de stratégies thérapeutiques.

De nos jours, de nouvelles connaissances dans le domaine de l'immunologie, de la neurologie et de la génétique, ainsi que les grandes avancées technologiques, ouvrent de nouvelles pistes sur l'origine de cette maladie.

## B) La sclérose en plaques

La SEP est une maladie auto-immune neurodégénérative et inflammatoire qui résulte de la destruction de la myéline et des tissus collatéraux associés dans le SNC (comprenant l'encéphale et la moelle épinière). Elle concerne environ deux millions et demi de personnes dans le monde et touche préférentiellement les femmes, avec une prévalence 2 à 3 fois plus élevée que pour les hommes. La SEP est considérée comme une maladie du jeune adulte, diagnostiquée en moyenne entre 25 et 35 ans. C'est une maladie très hétérogène d'un point de vue clinique et biologique, qui se manifeste par des troubles cognitifs, sensitifs, moteurs, oculaires, de la coordination, de l'équilibre et urinaire.

La SEP est définie par des lésions de démyélinisation de la substance blanche (SB) formant les plaques caractéristiques de la SEP et des lésions de la substance grise (SG) du SNC. Les lésions de la SB sont causées par l'infiltration immunitaire à travers la barrière hémato-encéphalique (BHE), qui va provoquer l'inflammation, la démyélinisation et la dégénérescence neuronale. Les lésions sont présentes dans tout le SNC mais se localisent préférentiellement au niveau des nerfs optiques, de la moelle épinière, du tronc cérébral, du cervelet ainsi que dans les régions périventriculaires de la SB<sup>247</sup>. C'est une maladie évolutive qui n'entraîne généralement pas de perte neuronale au commencement mais, du fait de son aspect chronique, finit par induire une perte neuronale et axonale corrélée à la gravité des symptômes. En fonction des caractéristiques et de l'évolution clinique, la SEP est divisée en 3 phases : la forme **récurrente-rémittente** (RRMS), la forme **secondairement progressive** (SPMS) et la **forme progressive primaire** (PPMS) (**Figure 13**). Les syndromes cliniques isolés (CIS) correspondent à un premier épisode de symptômes neurologiques causé par une inflammation ou une démyélinisation dans le SNC. En fonction de la détection de lésions lors de l'IRM, les sujets vont être classés en risque élevé de développer une SEP (présence de lésions) ou en risque faible (pas de lésions détectées).

Classiquement, le diagnostic de la SEP est basé sur les données cliniques du patient (symptômes disséminés ou non dans le temps et dans l'espace), un examen IRM (visualisation des lésions du SNC) et une ponction lombaire. L'analyse du liquide céphalo-rachidien (LCR) va permettre d'évaluer l'inflammation au niveau du SNC en fonction de la présence de bandes d'IgG oligoclonales spécifiques dans le LCR et/ou en déterminant l'index d'IgG pour évaluer la sécrétion intrathécale d'IgG. L'état du patient est évalué en fonction des signes cliniques et en s'appuyant également sur l'échelle EDSS (Expanded disability status scale) afin d'évaluer le degré de handicap.

## RRMS

Quatre-vingt-cinq pour cent des patients présentent au diagnostic une forme dite RRMS, caractérisée par des poussées correspondant à des atteintes neuronales symptomatiques, suivies par des phases de rémissions partielles ou totales. Une poussée va traduire un évènement inflammatoire résultant en foyers de démyélinisation localisés essentiellement dans la SB. Les poussées sont généralement sans séquelles grâce au processus de remyélinisation efficace en début de la maladie mais peuvent, dans certaines circonstances, aboutir à un rétablissement seulement partiel des fonctions neurologiques. L'étude des lésions ou plaques du SNC a permis de définir plusieurs catégories de lésions selon le degré de démyélinisation et la présence de cellules immunitaires. La phase RRMS est principalement caractérisée par la présence de lésions localisées dans la SB et correspondant à des plaques dites actives aiguës, qui se manifestent par des zones de démyélinisation sans atteinte axonale avec un infiltrat de macrophages et LT importants dans et autour des plaques. Une minorité de patients peut également présenter des plaques actives chroniques, définies par des lésions de démyélinisation avec une relative préservation axonale, une activation de la microglie et une répartition des cellules immunitaires, principalement autour des plaques<sup>248</sup>. Récemment, la présence de lésions au niveau de la SG ainsi que d'une inflammation méningée a été détectée chez les patients RRMS en phase aiguë<sup>249</sup>. La résolution de l'inflammation, la réorganisation des canaux sodiques (Na<sup>+</sup>) sur les axones des neurones ainsi que le processus de remyélinisation vont permettre de rétablir la conduction axonale et participer à la guérison des symptômes. En moyenne, dans la phase RRMS, les patients vont avoir 1 à 2 épisodes de poussées par an.

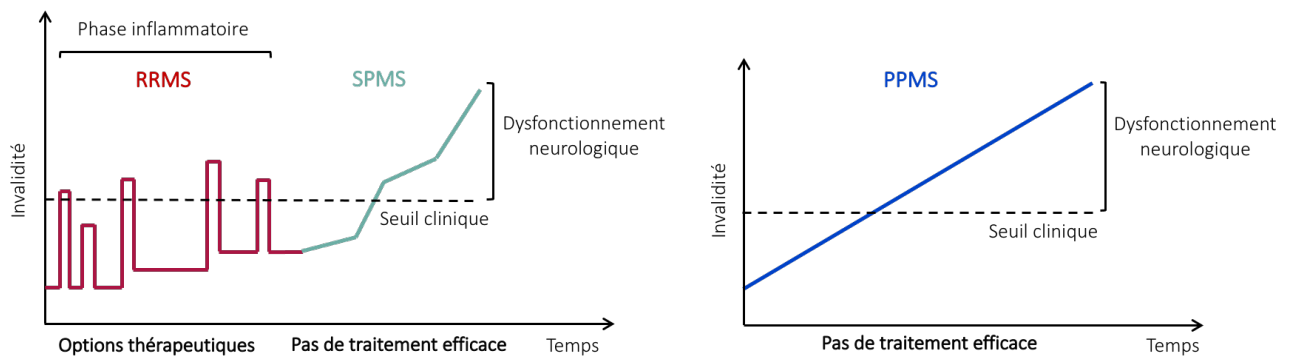
## SPMS

La forme SPMS est l'évolution naturelle de la forme RRMS. En effet, environ 50% des patients ayant été diagnostiqués SEP en phase RRMS vont entrer en SPMS après un délai de 5 à 10 ans, et 90% d'entre eux vont entrer dans cette phase après 25 ans. La forme SPMS est caractérisée par un déclin neurologique continu et irréversible, majoritairement non associé à des poussées. C'est une phase moins inflammatoire que la phase RRMS, avec des dommages permanents, des processus de réparation lents et inachevés dans de nombreux cas. Les patients en phase SPMS présentent majoritairement des lésions inactives dans la SB, correspondant à des zones démyélinisées avec perte d'axones, d'oligodendrocytes, une astrogliose et une infiltration immunitaire mineure<sup>250</sup>, ainsi que des lésions corticales de la SG. Ces lésions corticales sont prédominantes dans les phases progressives et sont liées à la gravité de la maladie<sup>251 252</sup>. La forme SPMS est souvent diagnostiquée rétroactivement avec une aggravation constante des troubles neurologiques indépendamment des rechutes ou poussées pendant au moins 6 à 12 mois. Les traitements actuels ne permettent pas d'éviter la dégradation cognitive et physique liée à la forme SPMS. La prévention du passage de la RRMS à SPMS est donc un objectif thérapeutique

majeur. Il a été observé que les phases répétées de démyélinisation induisent un épuisement des précurseurs des oligodendrocytes ne permettant plus la remyélinisation des axones<sup>253</sup>. De même, le stress que peut générer une réponse inflammatoire (cytokines, espèce réactive de l'oxygène, métabolites) peut impacter les mitochondries et le métabolisme du glutamate des neurones et participer à la dégénérescence axonale.

## PPMS

En moyenne, 10 à 15% des patients présentent au diagnostic une forme dite PPMS, avec une incidence identique entre homme et femme. Cette forme est caractérisée par une progression constante du handicap dès le début de la maladie et ceci de façon irréversible et continue, sans phase de récupération. Les patients en phase PPMS suivent une évolution clinique différente des autres phases, avec une absence d'exacerbations, de phases inflammatoires (ou très minoritaires) avant la progression clinique de la maladie<sup>254</sup>. Tout comme la phase SPMS, la forme PPMS est caractérisée par un faible infiltrat immunitaire et pas, ou très peu, de lésions actives dans la SB. Les lésions présentes chez ces patients sont principalement observées au niveau de la moelle épinière et dans les zones corticales du SNC avec une démyélinisation diffuse de la SG, une démyélinisation corticale, et une activation de la microglie<sup>252</sup>. Les traitements immunomodulateurs ou immunosuppresseurs montrent un certain bénéfice pour les patients, mais aucun médicament n'est efficace pour réduire la progression du handicap pour la majorité des patients PPMS.



**Figure 13 : Illustration des différentes phases de la SEP.**

La phase RRMS est caractérisée par des poussées inflammatoires résultant en la destruction de la myéline des neurones, mais elle est souvent associée à un rétablissement complet de la fonction neuronale. De nombreux traitements existent pour cette phase. Après 5 à 10 ans, la moitié des personnes diagnostiquées RRMS vont entrer en phase SPMS, décrite par des dommages neuronaux progressifs sans rémission et sans poussées inflammatoires. Enfin, à droite, la phase PPMS, peu décrite à l'heure actuelle, est caractérisée par un dysfonctionnement neurologique progressif dès le début de la maladie. Il n'y a pas de traitement de fond pour les phases SPMS et PPMS, seulement des traitements visant à atténuer les symptômes.

## Traitements

Il n'existe pas de traitement efficace pour les formes les plus graves de la maladie (SPMS et PPMS). Les traitements de fond efficaces en phase RRMS visent à réduire le taux d'apparition de nouvelles poussées en ciblant l'activation ou la migration des cellules immunitaires<sup>255</sup> (**Figure 14**). Les anti-inflammatoires (corticoïdes) sont prescrits en sus au moment des poussées pour limiter l'inflammation du SNC, mais sont également utilisés dans les phases SPMS et PPMS.

Traitement	Nom commercial	Famille	Phase	Action
Acétate de glatiramère	Copaxone, Glatiramer Mylan	Immunomodulateur	RRMS Traitement de fond	Ensemble de polypeptides synthétiques partageant des similarités avec la protéine MBP. Favorise une réponse anti-inflammatoire du SI.
Diméthyle furamate	Tectidéra	Immunomodulateur	RRMS Traitement de fond	Activation des gènes antioxydant via NRF2 (erythroid-derived 2-like 2).
Térfunomide	Aubagio	Immunomodulateur	RRMS	Bloque la voie de synthèse des pyrimidines: diminution de la prolifération des lymphocytes.
Azathioprine	Imurel	Immunomodulateur	RRMS	Antimétabolite qui inhibe la synthèse des nucléotides.
Méthylprednisolone	Solumedrol	Immunomodulateur	RRMS Traitement des poussées	Anti-inflammatoire glucocorticoïde.
Interferon $\beta$ (1a, 1b)	Avonex, Bétaféron, Rebif, Extavia, Plegridy	Immunomodulateur	RRMS et SPMS	Anti-inflammatoire : réduction de la fréquence des poussées.
Natalizumab	Tysabri	Immunosupresseur	RRMS Forme très active	Anticorps monoclonal qui se lie à la sous-unité $\alpha 4$ de l'intégrine $\alpha 4\beta 1$ : bloque la migration des lymphocytes dans le SNC.
Fingolimod	Gylénia	Immunosupresseur	RRMS Forme très active	Principe actif: phosphate de fingolimod qui agit en antagoniste des récepteurs S1P présent sur les lymphocytes induisant leur séquestration dans les SLO.
Rituximab	Mabthera	Immunosupresseur	RRMS	Anticorps monoclonal anti-CD20 : élimination des LB.
Alemtuzumab	Lemtrada	Immunosupresseur	RRMS Forme active	Anticorps monoclonal anti-CD52 : élimination des LB et LT.
Ocrelizumab	Ocrevus	Immunosupresseur	RRMS active et PPMS précoce	Anticorps monoclonal anti-CD20 : élimination des LB.
Mitoxantrone	Esep	Immunosupresseur	RRMS, SPMS et PPMS Progression rapide	Interaction avec l'ADN, bloque la prolifération <i>in vitro</i> des LB, LT et macrophages.
Cyclophosphamide	Endoxan	Immunosupresseur	SPMS et PPMS	Interaction avec l'ADN.
Methotrexate	Ledertrexate	Immunosupresseur	SPMS et PPMS	Antagoniste de l'acide folique: ralentie la prolifération des cellules immunitaire.

**Figure 14: Tableau des traitements proposés dans la SEP en France.**

### C) Étiologie de la SEP

L'étiologie de cette maladie auto-immune neurodégénérative comprend de nombreux facteurs, génétiques, épigénétiques, environnementaux et infectieux qui peuvent être impliqués dans la susceptibilité à la maladie mais également dans sa trajectoire clinique<sup>256</sup>.

### **a. Hypothèse génétique**

La composante génétique de la SEP est caractérisée par le risque accru de développer cette maladie au sein d'une famille. En effet, les frères et sœurs d'une personne ayant la SEP ont 20 fois plus de risque de développer la maladie (2 à 4%) par rapport à la population générale. Ce risque augmente lorsqu'il s'agit de jumeaux homozygotes (30 à 40%). Ces observations ont conduit à réaliser de nombreuses études GWAS (genome-wide association studies) qui ont notamment révélé une association entre les gènes liés au HLA-DR et la susceptibilité à la SEP. Il a été montré que les principaux marqueurs de susceptibilité à la SEP se situent sur le locus HLA-DRB1 dans la région du CMHII. Par exemple, le variant HLA-DRB1\*15 :01 est associé à un âge plus précoce de la maladie<sup>257</sup> mais également à une progression plus importante des atteintes cérébrales (lésions, volume cérébral etc.). A l'inverse, l'allèle HLA-B\*44 :02 (région CMHI) est considéré comme protecteur pour la SEP, puisqu'il est associé, entre autres, à un plus faible volume des lésions cérébrales détectées par IRM<sup>258 259</sup>. D'autres gènes non-HLA ont été décrits comme étant associés à la maladie tels que le gène du récepteur alpha à l'IL-7 (IL-7R $\alpha$ ) et du récepteur alpha à l'IL-2 (IL-2R $\alpha$ )<sup>260</sup> qui sont également impliqués dans l'homéostasie du système immunitaire.

Les études sur la prédisposition génétique sont vastes et continuent à s'enrichir. Toutefois, on peut déjà observer que la majorité des gènes qui confèrent une susceptibilité/prédisposition à la SEP sont liés au système immunitaire, ce qui est en faveur de l'hypothèse de la cause d'une dérégulation du SI dans l'étiologie de la SEP. Cependant, les facteurs génétiques ne suffisent pas à expliquer, à eux seuls, l'apparition de la SEP, comme le montre le taux de concordance chez les jumeaux homozygotes<sup>261</sup>. Le développement de la SEP est donc la résultante de la contribution de multiples gènes participant à déterminer un risque plus ou moins modéré, en combinaison avec des facteurs environnementaux.

### **b. Hypothèse virale**

L'hypothèse virale comme origine de la pathogenèse de la SEP a été investiguée depuis sa découverte. De nombreux virus ont été proposés comme impliqués dans le développement de la SEP tels que le CMV (cytomegalovirus) et le HHV-6 (herpesvirus humain de type 6), mais ce sont les études sur le virus d'Epstein-Barr (EBV) qui ont apporté les observations les plus probantes. En effet, une étude a révélé que sur 1047 patients CIS, un seul cas s'est révélé être séronégatif pour l'EBNA1, antigène nucléaire 1 du virus EBV<sup>262</sup>. De même, une sérologie positive pour l'EBV est en relation avec le passage d'un diagnostic CIS à la SEP et est associée au développement de la SEP pédiatrique. Il s'avère qu'une sérologie présentant un taux élevé d'IgG anti-EBNA1 est associée à l'apparition de nouvelles lésions cérébrales<sup>263</sup>. De plus, des LT spécifiques contre l'EBNA1 et reconnaissant la myéline ont été identifiés



chez certains patients<sup>264</sup>. En outre, une étude a montré une surreprésentation de variants du gène de l'EBNA2 chez les patients SEP, comparés aux donneurs sains, suggérant qu'une interaction complexe entre les variants génétiques de l'hôte et du virus peut contribuer au développement de la maladie<sup>265</sup>. D'autres travaux ont également mis en évidence la présence d'anticorps reconnaissant l'EBV dans le LCR des patients atteints de SEP<sup>266</sup>. Cette observation corrèle avec l'accumulation de LB et plasmocytes infectés par l'EBV au niveau du cerveau des patients<sup>267</sup>. De façon intéressante, les LB infectés par l'EBV sont situés au niveau de GC ectopiques (ou ELS) dans les lésions corticales chez les patients en phase SPMS<sup>268</sup>.

De nombreuses théories ont émergées concernant le mécanisme par lequel le virus EBV pourrait agir dans la SEP. Parmi eux, la théorie du mimétisme moléculaire qui montre que les LT CD4 mémoires spécifiques d'EBNA1, particulièrement les Th1, peuvent avoir une reconnaissance croisée avec les antigènes de la myéline<sup>264</sup>. D'autres études proposent que l'EBV dirige l'inflammation en favorisant la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par les LB infectés, ou encore est impliqué dans la migration des LT auto-réactifs et des LB dans le SNC<sup>269</sup>.

Toutefois, l'implication de l'EBV dans le développement de la SEP est très controversée et mérite de plus amples investigations. En effet, environ 90% de la population mondiale est infectés par ce virus<sup>270</sup>. Cette prévalence est largement supérieure à celle de la SEP. En outre, seulement 3 à 4% des LT CD4 spécifiques de l'EBNA1 réagissent avec les peptides dérivés des protéines de la myéline, et d'autres virus ont également le potentiel d'induire une réaction croisée avec les antigènes du SNC (coronavirus, virus de l'herpès 6, cytomegalovirus, rétrovirus endogène ou HERV)<sup>271 272</sup>.

### **c. Les facteurs environnementaux**

#### **Vitamine D**

La répartition de la SEP dans le monde suit, de façon générale, un gradient Nord-Sud dans l'hémisphère nord et Sud-Nord dans l'hémisphère sud, avec une fréquence de la maladie supérieure lorsque l'on s'éloigne de l'équateur<sup>273</sup>. Il est à noter que cette distribution est tout de même variable et peut dépendre de la qualité du diagnostic et des facteurs socio-économiques. Ce gradient est également observé en France, puisque la prévalence de la SEP est plus élevée dans le Nord que dans le Sud. Ce gradient de latitude apparent dans la distribution de la SEP a amené de nombreux travaux sur l'implication de la latitude et de la vitamine D (25-hydroxyvitamin D3) dans l'incidence de la SEP. Des études ont révélé que le taux de vitamine D, produite suite à une exposition au soleil, est corrélée avec le développement de la SEP. En effet, un taux élevé de 25-hydroxyvitamin D3 dans le sérum est en lien

avec un risque moins élevé de développer la SEP<sup>274</sup>. Des travaux menés sur des jumeaux monozygotes ont également conclu que ceux atteints de SEP sont moins exposés à la lumière du soleil que leur frère ou sœur en bonne santé<sup>275</sup>. De même, des travaux rétrospectifs ont montré qu'une augmentation du taux sérique de vitamine D est liée à une diminution du risque de rechute (activité inflammatoire, démyélinisation)<sup>276</sup> et de l'apparition de nouvelles lésions<sup>277</sup>. Des études cliniques de phase 2 ont été menées afin d'évaluer le bénéfice de l'apport de vitamine D chez des patients traités à l'interféron- $\beta$  (étude SOLAR par exemple). Les résultats de l'étude n'ont pas montré une amélioration significative des paramètres cliniques (EDSS) entre le groupe placebo et le groupe recevant un apport en vitamine D à forte dose. Toutefois, une réduction du nombre de lésions T1 et T2 à l'IRM a été observée chez les patients ayant reçu une supplémentation en vitamine D<sup>278</sup>.

De nombreux autres facteurs environnementaux ont été identifiés comme impactant la susceptibilité de la SEP, dont la cigarette et l'obésité, avec des modes d'actions multiples qui nécessitent une meilleure compréhension. Pour autant, il est intéressant de constater que le mode de vie d'un individu peut influencer le risque ou la gravité de la maladie.

#### **d. Hypothèse immunitaire**

La SEP est caractérisée par une réponse anormale du SI causant des dommages au SNC. Les cellules du SI ont été largement impliquées dans le processus de démyélinisation, avec notamment la détection de LT auto-réactifs contre la myéline chez des patients SEP<sup>279</sup> et d'un infiltrat de cellules immunitaires important lors des poussées. Cependant, la SEP n'est pas une MAI pour laquelle la cible antigénique des anticorps ou LT auto-réactifs est identifiée, comme cela peut être le cas pour la SLE ou le diabète de type 1. Toutefois, des LT circulants réactifs contre MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), MBP (myelin basic protein) et des protéines protéolipides (PLP) ont été identifiés chez les patients SEP<sup>279</sup>.

L'ensemble de ces données révèlent la complexité de l'étiologie de la SEP. Un ensemble d'événements peut être à l'origine du déclenchement de cette pathologie, certainement la combinaison de plusieurs facteurs, et différents d'un patient à l'autre. Cependant, même si c'est une maladie multifactorielle, les mécanismes physiopathologiques et plus particulièrement immunopathologiques sont communs et responsables des altérations observées chez ces patients. De nos jours, la SEP est classée comme maladie auto-immune, impliquant une inflammation et la présence de lymphocytes auto-réactifs qui participent à une réponse inappropriée contre les antigènes du SNC.

## II. Immunopathologie de la SEP

Depuis de nombreuses années, les travaux menés chez la souris et chez l'homme ont permis de mieux caractériser les cellules du SI intervenant dans le développement de la SEP. La pathogenèse de la SEP fait appel à des phases d'inflammation causées par l'infiltrat de cellules immunitaires dans le SNC ainsi qu'à des phases neurodégénératives<sup>280</sup>, résultant d'une altération des cellules du SNC. Le système immunitaire va endommager la myéline, les oligodendrocytes (cellules productrices de myéline dans le SNC) ainsi que les fibres nerveuses associées. Les oligodendrocytes sont des cellules de la névroglie interstitielle dont la fonction principale est de former la gaine de myéline autour des axones (fibres nerveuses). Les prolongements oligodendrogliaux vont s'enrouler autour de l'axone, initiés par des étapes de reconnaissance, afin de former une structure dense et compacte plus ou moins épaisse. Cette membrane va permettre de protéger les fibres nerveuses et d'accélérer la conduction de l'influx nerveux. La destruction de la myéline va participer au recrutement d'autres cellules immunitaires qui vont être impliquées dans l'inflammation du SNC.

### A) Modèle d'étude de la SEP : modèle EAE (expérimental auto-immune encephalitis)

Le développement du modèle EAE a permis d'étudier l'aspect immunologique, clinique et thérapeutique de la SEP. Initialement réalisées sur le singe, de nombreuses études ont testé le modèle sur différents types d'animaux résultant en une évolution clinique de la maladie très variable en fonction du fond génétique des animaux, de la source du matériel antigénique, mais également du mode d'injection de l'antigène<sup>281</sup>. Le modèle EAE ne regroupe pas l'ensemble des caractéristiques de la maladie mais présente des similitudes avec les maladies humaines démyélinisantes (SEP et encéphalomyélites virales) telles que l'atteinte axonale, la démyélinisation, les lésions au niveau du SNC, l'infiltration immunitaire associée à la présence d'Ig dans le LCR. Les modèles EAE les plus couramment utilisés sont les modèles murins et sont principalement générés par immunisation avec des peptides dérivés des protéines de la myéline telles que MOG, MBP et PLP. Il existe de nombreux protocoles d'induction de l'EAE chez la souris, avec une composante immunitaire plus ou moins importante et spécifique selon le modèle (**Tableau 2**).

Ces modèles sont de précieux outils dans la compréhension de la maladie mais comportent un certain nombre de limites. En effet, le développement de l'EAE dans la plupart des cas n'est pas un processus spontané et nécessite l'utilisation d'adjuvants relativement puissants comme des particules inactives de *Bordetella pertussis*, *mycobacterium tuberculosis* ou de l'adjuvant complet de Freud<sup>282</sup>. En outre, l'induction par immunisation avec des peptides dérivés des protéines de la myéline va favoriser

une réponse spécifique auto-réactive médiée préférentiellement par les cellules immunitaires de la réponse adaptative. L'immunisation et l'adjuvant peuvent constituer un biais dans la réponse immunitaire induite, en faveur notamment d'une réponse LT CD4 plus pathogénique, mais également moduler la perméabilité de la BHE via l'utilisation de la toxine pertussique. Enfin, des différences subsistent entre la souris et l'homme notamment dans les cytokines polarisantes des LT CD4 mais aussi dans la proportion de cytokines sécrétées. La forme passive d'immunisation pour l'induction de l'EAE va permettre de réduire l'influence des substances injectées hautement inflammatoires, et repose sur le potentiel autoréactif des cellules transférées. Cependant, la culture et la réactivité induite *in vitro* des LT spécifiques des peptides associés aux protéines de la myéline, ainsi que le nombre de cellules transférées, peut altérer artificiellement la réponse immunitaire observée. Le développement du modèle de souris transgénique avec des LT possédant un TCR transgénique autoréactif contre les protéines de la myéline a permis de réduire la forte activation des cellules du SI générée par les immunisations actives ou passives, mais reste un modèle essentiellement médié par les LT<sup>283</sup>. Le modèle double transgénique présentant un TCR et un BCR spécifique pour le peptide MOG permet, quant à lui, le développement de l'EAE avec une participation active des LB<sup>284</sup>.

Bien que les phases de la maladie soient distinguées d'un point de vue médical, les modèles d'études ne permettent pas de reproduire l'ensemble des caractéristiques des phases RRMS et SPMS. Toutefois, les modèles décrivant des phases inflammatoires sont associés à la phase RRMS, et les modèles non-inflammatoires correspondent davantage à la phase SPMS.

Modèle EAE	Induction	Fond génétique	Phase associée	Caractéristiques
<b>EAE RR</b>	Peptide PLP (139-151) Peptide MOG (35-55) Peptide MBP (84-102)	Souris SJL/J	Phase RRMS	Démyélinisation médiée par les LT. Infiltration immunitaire.
<b>EAE chronique</b>	Peptide MOG (35-55) Peptide MOG (34-56)	Souris C57BL/6 Souris Biozzi ABH	Phase chronique (RRMS, SPMS)	Évolution de la maladie variable. Paralyse, aggravation des symptômes puis guérison incomplète. Développement de lésions corticales.
<b>EAE chronique</b>	rMOG (1-125) recombinant	Souris C57BL/6	Phase chronique (RRMS, SPMS)	Lésions corticales.
<b>EAE Passive</b>	Transfert de LT spécifique de la myéline PLP (139-151), MBP (84-102) ou MOG (35-55) dans une souris receveuse	Souris C57BL/6 Souris SJL/J	Phase active (RRMS, SPMS)	Inflammation du SNC. Sévérité dépendante du fond génétique.
<b>EAE spontanée</b>	Souris transgénique	Souris C57BL/6 Souris SJL/J (souris RR)	Phase RRMS	Surexpression des récepteurs spécifiques de MOG (35-55) sur les LT (sous forme d'un transgène TCR <sup>MOG35-55</sup> ).
<b>EAE spontanée</b>	Souris double-transgénique (Souris OSE)	Souris C57BL/6 Souris SJL/J	Phase avec des lésions optico-spinales	Surexpression du TCR <sup>MOG35-55</sup> et de la chaîne lourde des IgG anti-MOG sur les LB.

**Tableau 2 : Tableau récapitulatif des principaux modèles EAE**<sup>282 285</sup>.

Il existe de nombreux modèles murins d'EAE qui peuvent avoir plus ou moins de similitudes avec la pathologie (symptôme, cinétique de démyélinisation, localisation des lésions, infiltrat immunitaire, état d'activation de la microglie etc.) en fonction du fond génétique murin, de l'antigène utilisé et de l'adjuvant.

## B) Immunopathologie de la SEP

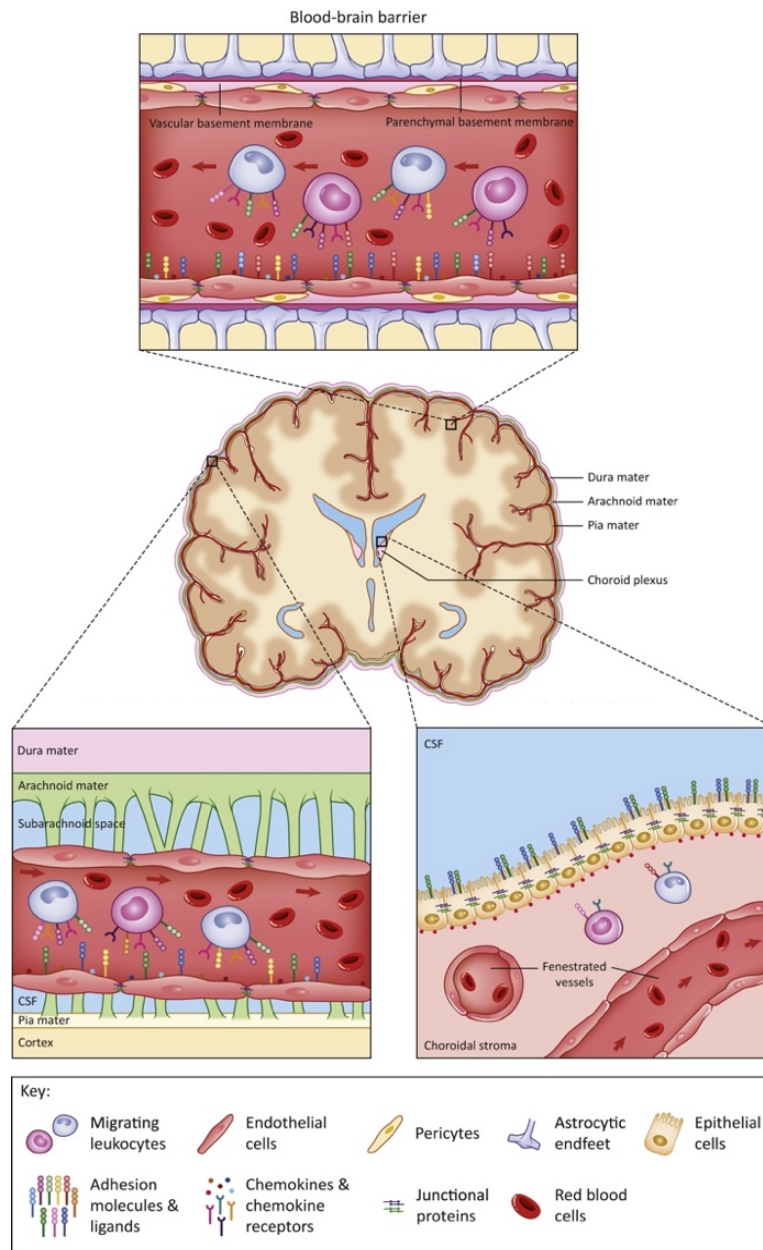
### a. Migration des cellules du SI dans le SNC

Durant de nombreuses années, le SNC était considéré comme un site immuno-privilégié de par une faible expression des molécules du CMH dans le parenchyme, une entrée restreinte des cellules du SI dans le SNC via le LCR et la BHE. Initialement, le SNC était considéré comme un organe ne recevant pas un drainage lymphatique « conventionnel ». Cependant, des études récentes ont permis de mettre en évidence la présence d'un système de drainage lymphatique dans l'espace périvasculaire du SNC, de vaisseaux lymphatiques tapissant les sinus duraux et connectés aux ganglions lymphatiques profonds<sup>286</sup>. Le SNC est composé deux types de fluides, le sang et le LCR. En raison de sa production locale par le

plexus choroïde, le LCR est considéré comme faisant partie intégrante du SNC. Le trafic cellulaire et moléculaire au sein du SNC est régulé principalement par la BHE, barrière physiologique qui sépare la circulation sanguine et le SNC. La BHE est constituée de cellules endothéliales, reliées par des jonctions serrées, autour des vaisseaux sanguins cérébraux, des pseudopodes astrocytaires, des péricytes et d'une lame basale permettant de contrôler la perméabilité de la BHE. Il existe également un réseau de vaisseaux sanguins fenestrés correspondant au plexus choroïde, situé au niveau des ventricules, qui va servir de passerelle pour le trafic de cellules immunitaires dans le LCR. Au niveau du plexus choroïde, la barrière de cellules épithéliales, par leurs sécrétions de chimiokines et molécules d'adhésion, et les macrophages et DC résidents, par leur capacité de présentation antigénique, vont participer au contrôle de la réponse immunitaire dans le SNC<sup>287</sup>.

La migration des cellules du SI à travers la BHE va impliquer différents acteurs dont les molécules d'adhésion, d'activation et de migration exprimées par les cellules endothéliales de la BHE et/ou les cellules immunitaires (**Figure 15**). Des nombreuses études ont permis d'établir que la migration des cellules du SI va dépendre des molécules d'adhésion VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1), ICAM-1 (intercellular adhesion molecule 1), PECAM-1 (platelet endothelial cell adhesion molecule 1), et de la P-sélectine, exprimées par les cellules endothéliales. Ces molécules vont interagir avec les récepteurs présents sur les cellules immunitaires, VLA-4 (very late antigen 4) aussi appelées intégrine  $\alpha 4\beta 1$ , LFA-1 (lymphocyte function associated molecule 1) ou intégrine  $\alpha L\beta 2$ , l'intégrine  $\alpha v\beta 3$  et PSGL-1 (P-selectin ligand-1) respectivement<sup>288</sup>. De plus, les chémokines telles que CCL2, CCL4, CCL5 et CXCL12 vont également faciliter la migration des cellules du SI en potentialisant l'affinité entre les molécules CAM (cell-adhesion molecule) et leur ligands<sup>289</sup>. D'autre part, la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires ( $TNF\alpha$ ,  $IL-1\beta$ ,  $IL-6$ ) par les cellules du SI va également promouvoir l'expression des molécules d'adhésion entraînant un influx supplémentaire de cellules inflammatoires dans le parenchyme. L'ensemble de ces molécules est détecté sur les cellules de la BHE dans des conditions physiologiques. Les facteurs qui promeuvent la migration au niveau du plexus choroïde vont être différents et impliquer notamment CCL20, constitutivement exprimé par les cellules épithéliales du plexus choroïde, chez l'homme et la souris, et son récepteur CCR6, présent sur les cellules du SI<sup>290</sup>.

Enfin, il a été montré dans la SEP, durant les phases inflammatoires, une augmentation de la perméabilité de la BHE associée à une augmentation de l'expression des molécules d'adhésion, facilitant ainsi l'apport de cytokines périphériques dans le SNC, l'infiltration des cellules du SI mais également l'activation des cellules gliales<sup>291</sup>. Une altération prolongée de la perméabilité de la BHE peut directement induire une inflammation locale par activation des astrocytes.



**Figure 15 : Trafic des cellules du SI à travers les barrières du SNC d'après Charabi et al., 2020.**

En haut, la BHE constituée d'un vaisseau parenchymateux entouré d'une membrane basale, de péricytes et de pieds astrocytaires. La migration à travers la BHE se produit via notamment l'interaction des molécules d'adhésion ICAM-1/LFA-1, VCAM-1/VLA-4 et P-selectin/PSGL-1.

En bas à gauche, un vaisseau sanguin présent au niveau de l'espace sous-arachnoïdien entouré de LCR et constituant un site de migration des cellules du SI.

En bas à droite, la migration au niveau du plexus choroïde, séparé du LCR par le stroma et une barrière de cellules épithéliales, implique l'axe CCL20/CCR6. Les molécules d'adhésion telles que VCAM-1 et ICAM-1 sont exprimées sur les cellules épithéliales mais du côté du LCR dans les ventricules.

## **b. Phase inflammatoire**

L'inflammation au niveau du SNC est surtout caractéristique des phases aiguës de la maladie. Lors des premières lésions observées chez les patients en phase RRMS, l'infiltrat se compose principalement de macrophages et de LT CD8. Les LT CD4, LB et plasmocytes sont, quant à eux,

trouvés en très faible quantité (**Figure 17**). Ces lésions sont majoritairement localisées dans la SB, dans la phase précoce de la maladie, et n'induisent pas ou peu de dommages en dehors du périmètre des lésions.

### Implication des cellules de l'immunité innée

L'inflammation du SNC dans la SEP va faire appel à l'intervention de cellules de l'immunité innée résidentes telles que la microglie (macrophages résidant dans le SNC) mais aussi à des cellules innées issues de la migration de la périphérie comme les macrophages, les DC, les monocytes et les cellules NK. Parmi ces cellules, les macrophages et la microglie sont particulièrement impliqués dans la pathogenèse de la SEP.

La microglie représente une population de cellules gliales qui sont des macrophages et constituent la première barrière de protection du SNC. En condition physiologique, ces cellules vont surveiller le micro-environnement mais également participer à la dynamique des synapses. Dans le modèle EAE, il a été montré que ces cellules sont capables de sécréter du TNF- $\alpha$  qui va induire la sécrétion de glutamate par les astrocytes, ce qui peut directement inhiber les transmissions synaptiques<sup>292</sup>. Des études menées sur le modèle EAE et chez les patients SEP ont montrées que la microglie au niveau des lésions de la SB possède un phénotype activé avec une forte sécrétion de cytokines (IL-6, IL-18, IL-1 $\beta$ ) et chimiokines (CCL2 et CCL5) inflammatoires<sup>293</sup>. L'activation de la microglie peut être également bénéfique pour le processus de remyélinisation par la phagocytose des débris de myéline et la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. En fonction de l'environnement, l'activation de la microglie va en effet avoir un effet pro ou anti-inflammatoire.

Durant les phases précoces de l'inflammation, l'infiltration des monocytes au niveau du SNC a été montrée dans le modèle EAE et est impliquée dans l'initiation de la démyélinisation des axones<sup>294</sup>. En outre, les macrophages sont capables de sécréter une grande quantité de cytokines pro-inflammatoires (IL-6, IL-12, TNF $\alpha$ , IL-1, IL-23) participant à l'inflammation et à la polarisation des LT CD4<sup>295</sup>. Tout comme les cellules gliales, les macrophages vont également promouvoir la réparation neuronale via leur capacité à phagocyter les débris de myéline.

Durant les phases actives aiguës, la microglie et les macrophages présentent un phénotype de type M1 après activation et participent à l'inflammation via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires<sup>296</sup>. En revanche, dans les phases plus tardives, les macrophages et la microglie ont plutôt un phénotype de type M2 et sécrètent des cytokines anti-inflammatoires (IL-10, IL-4, IL-13, IL-33, TGF- $\beta$ ) impliquées dans la réparation tissulaire et dans le développement d'une EAE atténuée<sup>297</sup>. En



outre, il a également été montré que les cellules de la microglie et les macrophages dans les lésions des patients SEP expriment un niveau élevé de GM-CSF; et que le GM-CSF, *in vitro*, permet de faciliter la migration des monocytes à travers la barrière endothéliale de la BHE<sup>298</sup>.

## Implication des lymphocytes T

### LT CD4

Chez l'homme, les lésions de la SB contiennent un large infiltrat de cellules immunitaires qui ont la capacité de traverser la BHE et d'entrer dans le parenchyme cérébral. Ces cellules participent à la destruction des oligodendrocytes et des neurones. La SEP est considérée comme une maladie conduite par les LT CD4 de par les risques de prédisposition génétique liés au complexe CMHII mais également par les découvertes basées sur le modèle EAE. Les différentes sous-populations de LT CD4 n'interviennent pas dans les mêmes proportions dans l'immunopathologie de la SEP. La présence de LT auto-réactifs contre la myéline (ou les protéines associées) a été détectée chez les patients SEP mais également chez les donneurs sains. Toutefois, les LT reconnaissant la myéline chez les patients SEP ont un état plus activé dans les populations mémoires, associés à la production d'IFN $\gamma$ , IL-17 et GM-CSF comparés aux LT réactifs contre la myéline des donneurs sains<sup>299</sup>. De plus, il a été montré que les LT réactifs contre la protéine MBP chez les patients SEP possèdent un TCR de meilleure affinité pour cette protéine que ceux isolés de donneurs sains<sup>300</sup>.

Initialement, les études sur le modèle EAE ont permis de décrire la pathogénicité des Th1, notamment grâce aux études chez les souris déficientes en IL-12 (IL-12p40<sup>-/-</sup>) qui développent une résistance à l'induction de l'EAE<sup>301</sup>. Cependant, des souris déficientes en IFN $\gamma$  (IFN $\gamma$ <sup>-/-</sup>) ou en STAT1 (STAT1<sup>-/-</sup>) ont développé une forme plus sévère d'EAE<sup>302</sup>. De ce fait, d'autres études se sont intéressées aux Th17 car l'IL-23, nécessaire à leur différenciation, partage la même chaîne IL-12p40 que l'IL-12. Les souris déficientes en IL-12p40 ou IL-23p19 sont résistantes à l'induction de l'EAE indiquant que l'IL-23, et non l'IL-12, est essentielle pour le développement de l'inflammation dans le SNC<sup>303</sup>. De plus, les souris déficientes au récepteur de l'IL-1 (IL1-R<sup>-/-</sup>) ont une incidence d'apparition de l'EAE fortement diminuée. L'IL-23 et le récepteur à l'IL-1 sont connus comme impliqués dans la différenciation des Th17<sup>304</sup>. Par ailleurs, des expériences de transfert adoptif de Th1 purifiés ont montré que les Th1 transférés sont capables d'induire l'EAE chez la souris naïve receveuse, et de faciliter le recrutement de Th17 au niveau du SNC<sup>305</sup>. Le transfert adoptif de Th17 spécifiques de MOG est également capable d'induire l'EAE chez une souris receveuse, et le co-transfert de Th1 et Th17 va accélérer le délai d'apparition de l'EAE<sup>306</sup>. Par ailleurs, les Th1 promeuvent l'infiltration de monocytes, macrophages au niveau de SNC, tandis que les Th17 vont plus attirer les neutrophiles sur le site de l'inflammation<sup>301</sup>. De manière intéressante, chez la souris, il a été également montré que les Th1/17, exprimant à la fois les

facteurs de transcription ROR $\gamma$ t et Tbet, sont capables de traverser la BHE et de s'accumuler au niveau du SNC tout au long de la phase inflammatoire<sup>307</sup>.

Chez les patients RRMS, il a été montré que les LT CD4 CCR6+ en périphérie qui reconnaissent la myéline, comportent à la fois une signature Th1 et Th17 avec la co-expression de l'IL-17A et de l'IFN $\gamma$ , suggérant que les Th1/17 sont des cellules pathogéniques dans la SEP<sup>308</sup>. De même, l'expression des cytokines IL-17 et IFN $\gamma$  a été détectée dans les tissus cérébraux des patients SEP suggérant la participation des Th1 et Th17 ou Th1/17 dans l'inflammation observée dans la SEP<sup>309 307</sup>. L'analyse transcriptomique des lésions de patients SEP, obtenue après autopsie, a révélé l'augmentation de l'expression des gènes codants pour des cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, l'IL-17 et l'IFN $\gamma$ <sup>310</sup>. Par ailleurs, une étude récente a montré la présence de Th1/17 mémoires (CCR6+CXCR3+) sécrétant fortement l'IFN $\gamma$  et le GM-CSF, comparés à leur homologue dans le sang, dans le LCR de patients CIS et RRMS<sup>311</sup>. Le potentiel des Th1/17 à traverser la BHE est donc supporté par la présence de ces cellules au niveau du LCR mais également par leur plus forte expression de l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, par rapport aux Th1 et Th17, ainsi que par leur capacité préférentielle à migrer *in vitro* à travers une monocouche de cellules endothéliales humaines de la BHE. Durant les poussées, la fréquence de LT sécrétant de l'IL-17 est augmentée dans le LCR des patients SEP, comparés aux patients en rémission ou n'étant pas dans une phase inflammatoire<sup>312</sup>. Chez l'homme, une étude a montré que les cellules endothéliales de la BHE expriment les récepteurs de l'IL-17 et l'IL-22, et que ces cytokines peuvent perturber l'intégrité des jonctions serrées de la BHE et ainsi favoriser l'infiltration immunitaire<sup>313</sup>. D'autre part, le dosage de cytokines dans le sérum de patients en phase RRMS, comparés aux sujets sains, a mis en évidence une augmentation du taux d'IFN $\gamma$ , d'IL-6, d'IL-12 et d'IL-4. Le taux de TNF $\alpha$  et d'IL-10 est plus élevé chez les patients ayant une forme inactive comparés aux patients RRMS avec une forme active<sup>314</sup>.

Les études sur l'implication des cytokines sécrétées par les Th17 dans le développement de l'EAE ont notamment révélé que le TNF, l'IL-21, l'IL-22 et l'IL-17F n'impactent pas ou peu le développement de l'EAE<sup>315 316</sup>. L'implication de l'IL-17A dans l'induction de l'EAE est encore controversée, mais une récente étude a montré que l'utilisation d'un anticorps anti-IL-17A lors de l'induction de l'EAE induit une résistance à l'EAE, associée à une diminution du nombre de LT CD4 exprimant du GM-CSF et/ou de l'IFN $\gamma$ , ainsi qu'un défaut de production d'IL-1 $\beta$  par les cellules myéloïdes. Toutefois, l'effet de l'anticorps anti-IL-17A est réduit lorsqu'il est utilisé dans les phases actives de l'EAE<sup>317</sup>. En outre, tout comme les souris déficientes en IL-1, IL-6 et IL-23<sup>318 319</sup>, il a été démontré que les souris déficientes en GM-CSF, sécrété notamment par les Th17 et Th1, sont résistantes à l'induction de l'EAE<sup>320</sup>. L'infiltrat immunitaire dans SNC est fortement réduit chez ces souris, et ne persiste pas dans le temps, contrairement aux souris contrôles. A l'inverse, le traitement des souris EAE

avec du GM-CSF recombinant entraîne une augmentation de la fréquence des « poussées » et une aggravation de la maladie. Le transfert passif de LT CD4 spécifique de MBP surexprimant le GM-CSF induit une EAE plus sévère, comparé au transfert de LT CD4 ne surexprimant pas le GM-CSF<sup>321</sup>. Il a été proposé que la sécrétion d'IL-23 et d'IL-1 $\beta$  par les APC induit la production de GM-CSF et d'IL-17A par les Th17<sup>322</sup>. En outre, dans le modèle EAE, il a été suggéré que les LT CD4 infiltrant le SNC peuvent être réactivés par les DC, aboutissant au recrutement de monocytes et à l'activation des LT CD4 naïfs par « epitope spreading », correspondant au développement d'une réponse immunitaire envers des épitopes différents de celui responsable de la maladie<sup>323</sup>.

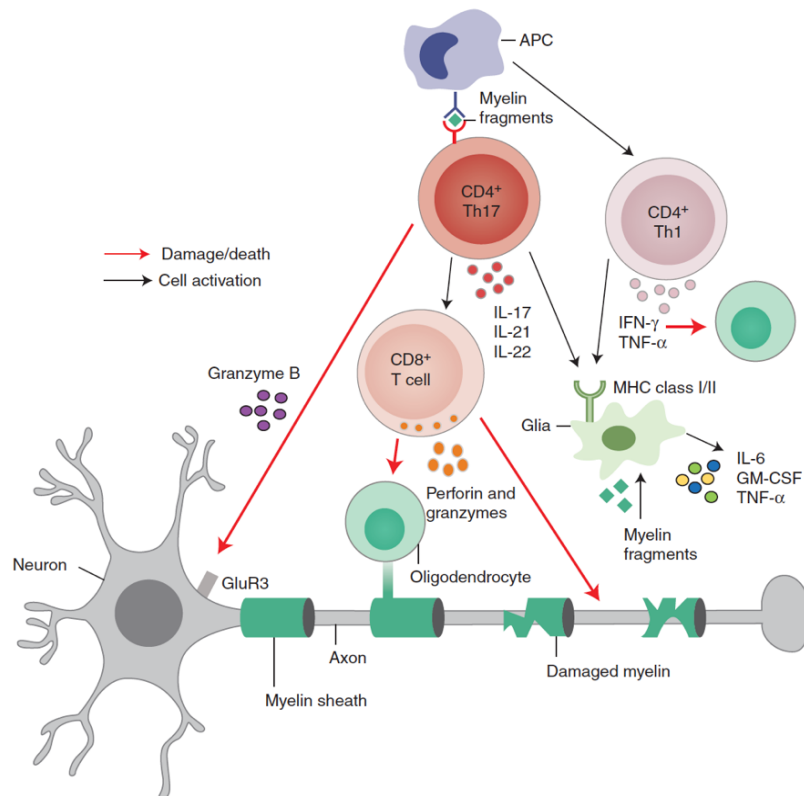
Il a été notamment proposé que les Th17, via leur sécrétion d'IL-17, vont participer à la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires telles que l'IL-6, GM-CSF et le TNF $\alpha$  et de chimiokines (CXCL8, CXCL2, CCL20) permettant le recrutement de neutrophiles, macrophages et LT, mais également l'activation de la microglie. En outre, l'IL-22, sécrétée par les Th17, est présente en plus forte concentration dans le sérum des patients en phase RRMS actives par rapport aux sujets sains. L'IL-22 et son récepteur sont localisés préférentiellement au niveau des vaisseaux sanguins et des lésions du SNC chez les patients SEP<sup>324</sup>. En outre, l'activation des récepteurs à l'IL-17 et l'IL-22 présents sur les cellules endothéliales de la BHE participe à l'augmentation de la perméabilité de la BHE *in vitro* et *in vivo* dans le modèle EAE<sup>313</sup>. Les cytokines inflammatoires sécrétées, notamment par les LT CD4, vont pouvoir activer la microglie, impliquant la sécrétion de cytokines inflammatoires (IL-6, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IL-12) par la microglie, mais également l'induction de l'expression du CMHII, très peu exprimé à l'état basal<sup>325</sup>. Des études ont proposé, du fait de cette expression du CMHII, que la microglie pouvait jouer un rôle d'APC pour réactiver localement les LT, mais cela reste encore controversé<sup>326</sup>. Concernant les Th1, il a été montré que l'IFN $\gamma$  peut participer à l'activation de la microglie mais également à la destruction des oligodendrocytes<sup>327</sup>, et que de plus, l'IFN $\gamma$  est capable de promouvoir la capacité de présentation antigénique des cellules myéloïdes présentes notamment au niveau des méninges, et ainsi favoriser la réactivation des LT CD4 et CD8 auto-réactifs.

L'ensemble des données récoltées à partir du modèle EAE ainsi que des observations chez les patients SEP, supporte donc l'implication des LT CD4 Th1, Th17 et Th1/17 dans la pathogenèse de la SEP.

## **LT CD8**

Concernant les LT CD8, leur fréquence dans les lésions actives, inflammatoires et dans le LCR des patients SEP est plus importante que celle des LT CD4<sup>328 329</sup>. La fonction principale des LT CD8 est de détruire les cellules cibles via la production de granzyme et perforine (**Figure 16**). Les dommages

axonaux sont davantage corrélés aux nombres de LT CD8 et de macrophages qu'au nombre de LT CD4<sup>330</sup>. De plus, le complexe du CMHI est fortement exprimé par les astrocytes, les oligodendrocytes et les neurones, ce qui pourrait permettre l'activation des LT CD8 et augmenter leur capacité cytotoxique<sup>331</sup>. Chez les patients SEP, il a été montré que les LT CD8 dirigés contre la myéline peuvent être réactivés par les APC via le complexe CMHI<sup>332</sup>. De nombreuses études ont révélé une expansion clonale des LT CD8 au niveau des lésions, du sang périphérique ainsi que du LCR des patients SEP<sup>328</sup><sup>333</sup>. Par ailleurs, des LT CD8 sécrétant d'IL-17 ont été identifiés<sup>334</sup>.



**Figure 16 : Implication des LT CD4 et LT CD8 dans le SNC, d'après Kaskow et Beacher-Allan, 2018.**

Une fois dans le SNC, les Th1, Th17, Th1/17 et LT CD8 vont contribuer à générer un environnement pro-inflammatoire qui va participer à la démyélinisation et/ou la mort des oligodendrocytes. Les cytokines sécrétées vont participer à l'activation de la microglie qui va exprimer les complexes CMHI et CMHII à leur surface permettant ainsi de restimuler des LT auto-réactifs mais également de maintenir l'inflammation via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires. De plus, l'IL-17 et la granzyme B peuvent induire la destruction des neurones via le récepteur au glutamate (GluR3). Les granules cytolytiques des LT CD8 vont détruire les oligodendrocytes et les neurones. Les LT vont également pouvoir être restimulés dans les méninges avant de traverser la membrane limitante gliale.

### Lymphocytes B et plasmocytes

L'activation des LB chez les patients SEP a été mise en évidence avec la découverte des bandes oligoclonales d'IgG dans le LCR des patients qui est, aujourd'hui, utilisé comme un outil diagnostique. Ces Ig sont produites localement par des plasmocytes et sont présentes chez plus de 95% des patients SEP<sup>335</sup>. Les plasmocytes ont été détectés au niveau des espaces périvasculaire des lésions aiguës et

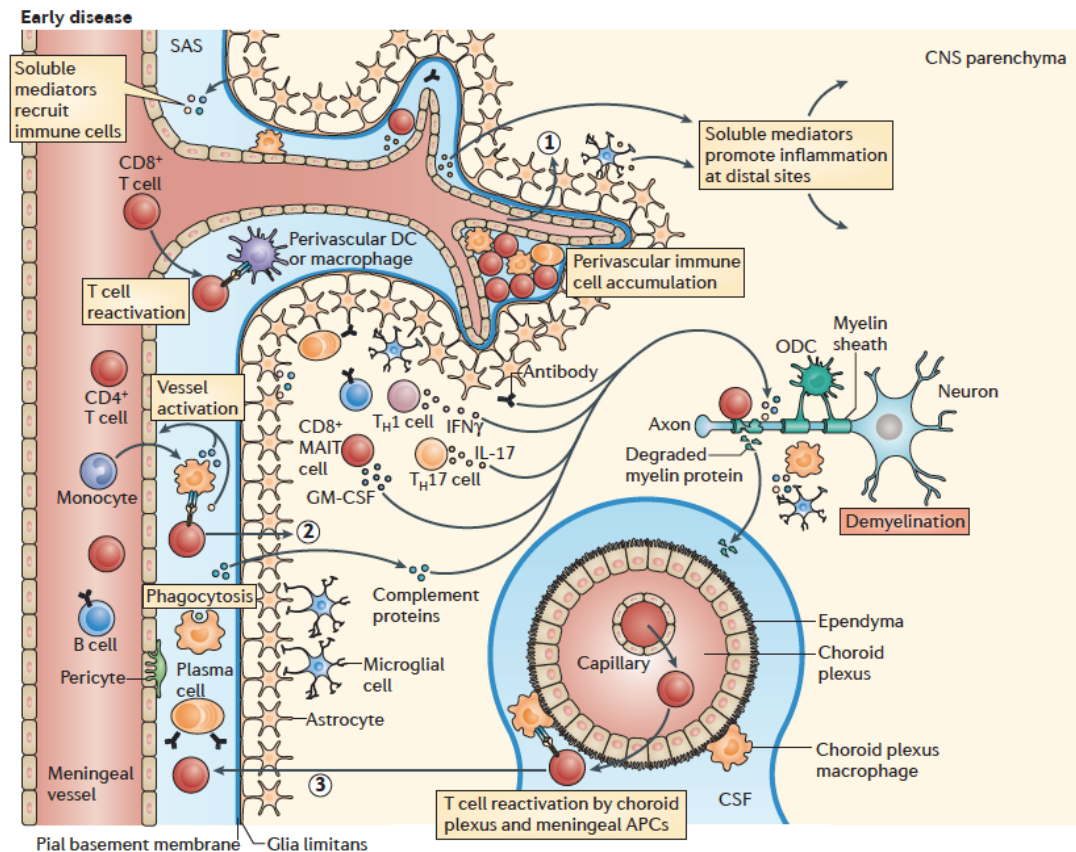
chroniques<sup>336</sup> et leur nombre augmente avec l'âge chez les patients SPMS et PPMS. Par ailleurs, des dépôts d'Ig et des molécules du complément sont retrouvés au niveau des sites de démyélinisation du SNC des patients<sup>337</sup>. L'implication des anticorps spécifiques des protéines de la myéline comme MOG, MBP, PLP dans le développement de la SEP est sujet à controverse. En effet, des auto-anticorps réactifs contre MBP ont été trouvés dans le sérum des patients SEP mais également dans celui des donneurs sains<sup>338</sup>. Des études sur la souris ont montré que la production constitutive d'anticorps dirigés contre MOG est suffisante pour induire l'EAE, via l'activation des LT périphériques, en absence de LB<sup>339</sup>. Une étude a également révélé que des anticorps isolés du LCR de patients atteints de SEP sont capables d'induire des dommages neuronaux et un processus de démyélinisation médié par le complément sur des tissus du SNC *ex vivo*<sup>340</sup>. Toutefois, la réussite des thérapies ciblant les LB comme le rituximab ou l'ocrelizumab, deux anticorps monoclonaux dirigés contre le CD20, s'appuie davantage sur le rôle pathogénique des LB, indépendamment de la sécrétion d'Ig, en phase RRMS. En effet, il n'y a pas de diminution des bandes d'Ig oligoclonales dans le LCR et le sérum, du fait de l'absence du CD20 sur les plasmocytes<sup>341</sup>. De façon intéressante, il a été montré que des plasmablastes et des plasmocytes dans les lésions des patients SEP expriment l'IL-10, suggérant que ces cellules peuvent également être impliquées dans le contrôle de l'inflammation<sup>342</sup>. Il a été observé une expression d'IL-10 par les plasmocytes dans le modèle EAE qui participent, entre autres, à inhiber les DC dans la génération de LT pathogéniques<sup>343</sup>.

Chez les patients CIS, il a été montré que le nombre de LB est augmenté dans le LCR, et que les LB en périphérie présentent une augmentation de l'expression de la sous-unité  $\alpha 4$  de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ <sup>344</sup>. En outre, les LB des patients SEP en phase RRMS active ont une expression plus importante des molécules CD40, CMHII et CD80, comparés aux donneurs sains<sup>345 346</sup>. Selon le modèle EAE utilisé, le rôle des LB dans la pathogenèse va être différent en fonction notamment du type d'immunisation (protéine ou peptide) qui va faire appel (immunisation protéinique) ou non (immunisation peptidique) aux propriétés APC des LB. En effet, chez les souris OSE, les LB sont responsables de la capture de l'antigène MOG soluble et de la présentation antigénique aux LT<sup>347</sup>. En revanche, chez les souris RR, les LB vont principalement être responsables de la production d'auto-anticorps démyélinisants<sup>348</sup>. L'ablation sélective du CMHII sur les LB des souris EAE, immunisées par la protéine recombinante humaine MOG, induit une résistance à l'induction de la maladie suggérant que les LB jouent un rôle d'APC dans ce modèle<sup>349</sup>. En outre, il a été montré que, *in vitro*, les LB mémoires de patients RRMS induisent une plus forte prolifération des LT CD4 en présence de MBP, comparés aux sujets sains<sup>350</sup>, ainsi qu'une plus forte sécrétion d'IFN $\gamma$  suggérant un potentiel rôle des LB mémoires des patients RRMS dans la présentation antigénique et l'activation des LT.

Par ailleurs, les LB activés ont la capacité de sécréter des cytokines pro-inflammatoires telles que la  $LT\alpha$ , le  $TNF\alpha$ , l'IL-15, l'IL-6 et le GM-CSF, dont la sécrétion est augmentée chez les LB isolés de patients SEP, comparés aux LB de donneurs sains<sup>341 351</sup>. L'absence de sécrétion d'IL-6 par les LB, spécifiquement chez les souris EAE, induit une diminution de la réponse Th17 et de la sévérité de l'EAE. En outre, les PBMC isolées de patients RRMS, avant et après traitement au rituximab, montrent une réduction de la sécrétion d'IL-17A, mais pas d'IFN $\gamma$ , lorsque les LB sont déplétés des PBMC, suggérant que les LB contribuent à l'inflammation dans la SEP<sup>351</sup>. Chez l'homme, il a été montré une diminution de l'expression de l'IL-22 et du nombre de Th17, mais pas de Th1, au niveau des articulations des patients PAR traités avec le rituximab, ce qui soutient le rôle des LB dans le développement d'une réponse de type Th17 dans les maladies auto-immunes<sup>352 346</sup>.

De plus, les LB ne sont pas seulement une source de cytokines pro-inflammatoires mais peuvent également avoir une fonction régulatrice de par leur sécrétion d'IL-10 et de TGF- $\beta$  chez l'homme, associée à la production d'IL-35, uniquement chez la souris. Chez les patients en RRMS, il a été observé une diminution de la sécrétion d'IL-10 par les LB, comparés aux donneurs sains<sup>341</sup>. En outre, une déficience d'IL-10 spécifiquement sur les LB chez la souris induit une EAE plus sévère<sup>353</sup>. A l'inverse, le transfert de LB sécréteurs d'IL-10 chez une souris EAE atténue la maladie<sup>354</sup>.

Les rôles supposés des LB dans la progression de la maladie sont multiples, passant de la sécrétion d'auto-anticorps, de cytokines pro-inflammatoires, de leur capacité de présentation antigénique, mais aussi de leur rôle protecteur via la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires. L'ensemble de ces données suggère une activation anormale des LB dans le SNC des patients SEP et leur rôle dans la propagation de la maladie.



**Figure 17 : Dérégulation du SI au niveau du SNC dans les phases précoces de la SEP (phases inflammatoires), d'après Dendrou et al., 2015.**

Lors des phases précoces de la maladie, correspondant à la phase RRMS chez l'homme, les cellules immunitaires vont infiltrer le SNC par les vaisseaux sanguins des méninges (1), par l'espace sous-arachnoïdien (2) ou par le plexus choroïde (3). Ces cellules vont s'accumuler au niveau des espaces périvasculaires ou directement dans le parenchyme du SNC. Les cellules du SI provenant de la périphérie, les cellules gliales et les astrocytes vont favoriser la démyélinisation des oligodendrocytes et la destruction des neurones par des mécanismes de contact direct ou par la sécrétion de médiateurs solubles.

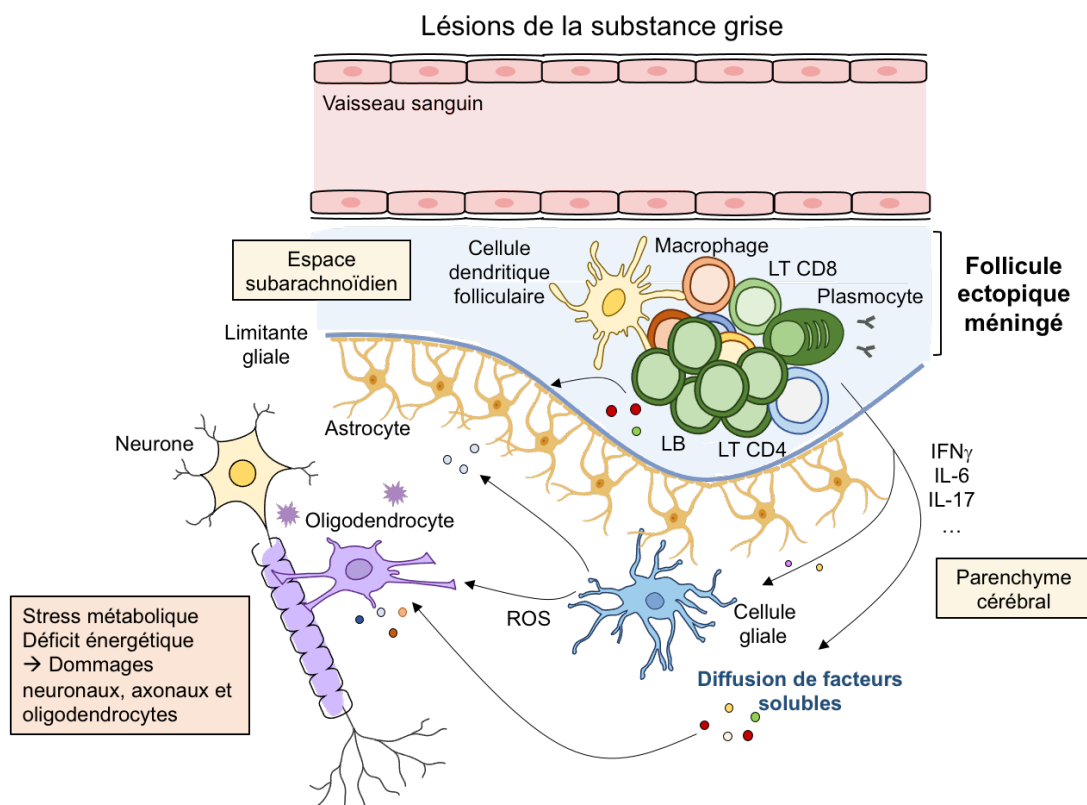
### c. Phase non inflammatoire

A mesure que la maladie progresse, l'inflammation va se relocaliser au niveau des méninges et des espaces périvasculaires, avec une réduction importante de l'infiltrat immunitaire au niveau des lésions dans le parenchyme. Dans les phases tardives, le processus neurodégénératif chronique va se maintenir et engendrer des dommages sur les neurones, notamment via une activation des astrocytes et de la microglie dans le parenchyme cérébral<sup>355</sup>. Toutefois, les cellules du SI vont s'organiser en structure assimilable à des ELS, particulièrement au niveau des méninges. Ces structures sont composées d'un cluster de LB prolifératifs, de plasmablastes, de plasmocytes, de FDC produisant du CXCL13 et des LT, faisant écho à la constitution des centres germinatifs des SLO. Ces centres germinatifs ectopiques (eGC) sont détectés chez 40 à 50% des patients en SPMS, et peu présents dans les phases RRMS et PPMS<sup>226</sup>. En effet, une étude a montré la présence d'eGC dans les méninges de 4 patients sur 12 en phase RRMS

aiguë. Dans cette étude, les patients qui présentent une inflammation méningée avec des eGC ont une durée moyenne de la maladie de 2 ans<sup>356</sup>. Chez les patients SPMS, la présence de ces eGC est corrélée à la gravité de la maladie avec un âge d'apparition du handicap irréversible ainsi que du décès plus précoce par rapport aux patients SPMS n'ayant pas d'eGC. De même, les patients avec des eGC ont un nombre plus élevé de lésions actives, chroniques actives et chroniques inactives au niveau de la SG par rapport aux patients sans follicules ectopiques. Ces eGC ont été identifiés à proximité immédiate ou jouxtant de larges lésions corticales sous-piales suggérant l'implication de facteurs solubles sécrétés au niveau de ces structures. En effet, un gradient de perte des neurones, oligodendrocytes et astrocytes a été observé dans le parenchyme associé à la présence de ces ELS<sup>357</sup>. De même, chez les patients SPMS avec ELS, des dommages de la limitante gliale et une augmentation de l'activation de la microglie ont été identifiés au niveau de la zone corticale des lésions sous-piales de la substance grise. Aucune différence n'a été observée au niveau des lésions de la SB entre les patients SPMS avec ou sans eGC, suggérant que ces structures sont fortement associées aux lésions de la SG (**Figure 18**).

La phase PPMS est davantage caractérisée par une infiltration périvasculaire et méningée de cellules immunitaires, associée à l'absence d'eGC. L'augmentation de la démyélinisation et la perte neuronale corticale est associée à une forte inflammation méningée. Toutefois, des agrégats de cellules immunitaires ont pu être observés, mais constituent un événement moins fréquent comparé aux formes SPMS, et ne sont pas caractérisés par la présence d'eGC<sup>358</sup>.





**Figure 18: Schéma illustrant les follicules ectopiques, ou eGC, méningé chez les patients SPMS.**

Des structures ectopiques contenant des LB prolifératifs, des FDC et des LT principalement, ont été retrouvées dans les méninges de 40 à 50% des patients SPMS et corrélient à la gravité de la maladie. La perte neuronale associée à ces structures ainsi que l'activation de la microglie suggèrent que des facteurs solubles maintiennent une forme d'inflammation localisée. Le stress métabolique dû notamment à la sécrétion de ROS va contribuer à la destruction des neurones et oligodendrocytes, et fait partie des phénomènes de neurodégénérescence observés dans la SEP.

### C) Les TFh dans la SEP

L'implication des LB dans la phase RRMS, ainsi que la présence d'ELS dans la phase SPMS soutiennent une implication potentielle des TFh dans le développement de la SEP. Des études d'association pangénomique (GWAS) sur les patients SEP ont révélé que le polymorphisme des gènes associés aux TFh, IL-21 et CXCR5, constitue un facteur de risque pronostique ou de susceptibilité de la SEP respectivement<sup>359 360</sup>. En outre, les transcrits de CXCL13 et d'ICOS sont retrouvés dans les échantillons de LT CD4 positifs pour les tétramères MOG et PLP, isolés à partir des PBMC de patients SEP, mais pas dans les échantillons négatifs suggérant que les LT CD4 spécifiques pour la myéline présentent notamment une signature TFh<sup>308</sup>. Par ailleurs, l'analyse du LCR de patients RRMS a révélé que la présence de CXCL13 dans le LCR des patients est fortement associée au risque de développer une maladie active (évolution de l'EDSS, apparition de nouvelles lésions, occurrence des lésions plus élevées). En effet, les patients en phase RRMS qui présentent des lésions corticales ont une forte augmentation du niveau de CXCL13 dans le LCR, comparés aux patients n'ayant pas de lésions

corticales ; et ce taux est corrélé à l'apparition de nouvelles lésions corticales<sup>361</sup>. Une étude s'est intéressée à la contribution de l'inflammation systémique dans la progression de la SEP et a montré que l'expression d'ICOS et de l'IL-21R des LT CD4 circulants augmente chez les patients SPMS et PPMS. L'expression de l'IL-21 augmente seulement chez les patients SPMS suggérant une augmentation de l'activation des TFh dans cette phase<sup>362</sup>. De plus, la fréquence des TFh ICOS+ augmente dans le LCR des patients SPMS et est corrélée à la gravité de la maladie (score EDSS). Dans les phases RRMS, SPMS et PPMS, il a été observé une diminution de la fréquence des cTFh1, et une augmentation des cTFh17 a également été constatée mais uniquement chez les patients PPMS. Ces données suggèrent une dérégulation ainsi qu'une altération de la proportion des cTFh dans la SEP. En outre, une étude a révélé une augmentation de l'ARNm de l'IL-21 dans les PBMC des patients SEP, ainsi qu'une augmentation de la concentration en IL-21 dans le sérum des patients, comparés aux donneurs sains. Ces deux paramètres sont corrélés positivement au score EDSS et l'index de progression de la maladie, suggérant l'implication de l'IL-21 sécrétée par les TFh et/ou les Th17 dans la progression de la maladie<sup>363</sup>.

Dans le modèle EAE, il a été montré que le transfert de Th17 provenant d'une souris EAE (Th17-EAE) immunisée par MOG<sub>35-55</sub>, mais pas avec des Th1 ou Th2, induit la formation des eGC ou d'agrégats composés de LB et LT au niveau des méninges et de la moelle épinière. La fréquence et le nombre de TFh (CXCR5+PD1+) au niveau du SNC et de la moelle épinière est corrélé par le nombre de LB, la fréquence de LB mémoires, et le développement de la maladie suggérant une interaction entre les TFh et les LB dans le SNC<sup>364</sup>. En outre, l'isolement des LT CCR6+ des eGC, initié par le transfert de Th17-EAE, révèle l'expression des molécules CXCR5+, ICOS+, Bcl-6+ qui sont les marqueurs caractéristiques des TFh, suggérant que les LT transférés peuvent acquérir un phénotype TFh dans le SNC<sup>365</sup>. De plus, la population de CXCR5+ isolée du SNC est enrichie en cellules exprimant l'IL-17. Toutefois, il est possible qu'en réalité le transfert de Th17 induise une activation des TFh, et non une modification du phénotype des Th17, dont les TFh sécrétant l'IL-17 (TFh17) au niveau du SNC. Dans ce sens, une autre étude a démontré que les TFh retrouvés au niveau du SNC ne sont pas dérivés des Th17 transférés mais constituent une seconde vague d'infiltration<sup>364</sup>. En effet, le transfert de TFh spécifiques de la myéline n'induit pas l'EAE chez la souris receveuse, notamment par l'absence de leur infiltration au niveau du SNC. Les Th17 vont donc participer à créer un environnement pro-inflammatoire qui va, en retour, induire le recrutement des TFh sur le site d'inflammation. Leur prolifération et l'interaction avec les LB va contribuer à aggraver le développement de la maladie. Par ailleurs, la migration des TFh dans le SNC est dépendante de CXCL13 chez la souris, puisque l'utilisation d'un anticorps anti-CXCL13 entraîne une diminution de l'infiltration des TFh, mais pas des LB, et également un développement d'une EAE moins sévère (moins de lésions inflammatoires avec moins de plaques de démyélinisation)<sup>366</sup>. Chez les patients RRMS, la concentration de CXCL13 est augmentée dans le LCR et corrèle au nombre de LT CD4 dans celui-ci<sup>367</sup>. L'ensemble de ces données

suggère que les TFh peuvent migrer dans le LCR des patients et y rester en raison de la présence de CXCL13 dans toutes les phases de la maladie<sup>368</sup>.

Concernant les TFr, une étude a montré que leur fréquence est diminuée dans la circulation sanguine des patients atteints de SEP comparés aux donneurs sains, avec un ratio TFh/TFr en faveur des TFh, et une diminution de leur fonction suppressive<sup>126</sup>. L'augmentation de ce ratio TFh/TFr, chez les patients RRMS, est corrélée à la quantité d'IgG intrathécales mesurée. Les patients RRMS ayant le plus fort ratio ont également un pourcentage de LB circulants plus élevé comparé aux donneurs sains et aux patients RRMS possédant un ratio TFh/TFr comparable aux donneurs sains<sup>369</sup>.

Au vu de la complexité de l'origine de la SEP, de récentes études se sont intéressées à l'impact du microbiote intestinal dans le développement de cette maladie. Le microbiote intestinal fait partie des facteurs environnementaux impliqués dans la pathogenèse de la SEP. En effet, des données de la littérature indiquent que la composition du microbiote peut impacter les propriétés des cellules du SI intestinales mais également des LT du SNC dans les modèles EAE. De plus, les patients RRMS présentent une composition différente de leur microbiote intestinal par rapport aux sujets sains. Au cours de ma thèse, nous nous sommes donc particulièrement intéressés aux caractéristiques des LT CD4, notamment des TFh, d'origine intestinale dans la SEP.

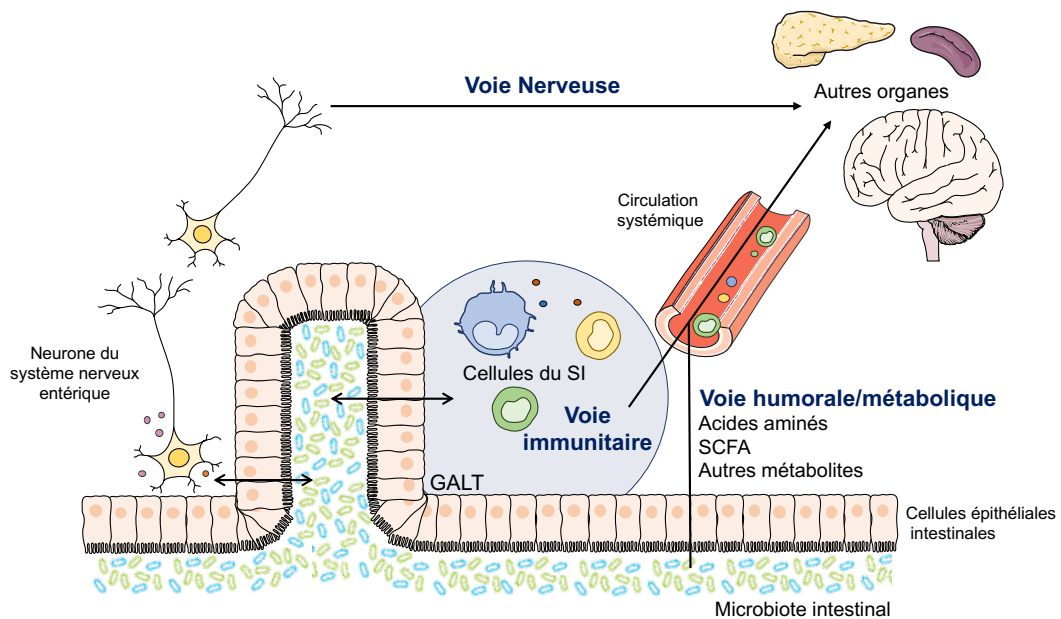
## Chapitre 4 : Le cas des GALT dans la SEP

### I. Relation entre le microbiote intestinal et l'organisme

Le microbiote intestinal est composé de trillions de micro-organismes, incluant bactéries, parasites, champignons, virus, présents le long du système gastro-intestinal (tube digestif supérieur, intestin grêle et gros intestin) évoluant dans une relation symbiotique avec l'hôte, en assurant notamment la protection de l'intestin contre une potentielle colonisation d'agents pathogènes. Chez l'homme, le microbiote intestinal représente la plus grande communauté diversifiée de micro-organismes, avec environ plus de 500 espèces différentes<sup>370</sup>. Leur quantité et leur composition diffèrent le long du tractus intestinal, avec une colonisation bactérienne supérieure au niveau du colon comparé à l'intestin grêle. Les rôles principaux du microbiote vont être de faciliter la digestion et la fermentation des carbohydrates, de synthétiser des vitamines essentielles (vitamine B12, B8, K etc.), d'exercer une compétition entre les nutriments pour maintenir une « pression de sélection » et empêcher ainsi à des agents pathogènes l'accès aux nutriments<sup>370</sup>. Les études actuelles montrent que la colonisation bactérienne se produit principalement après la naissance, au contact de la flore vaginale après un accouchement par voie basse, ou de micro-organismes présents dans l'environnement. La composition du microbiote est très variable entre nouveaux-nés, influencée par l'alimentation, la génétique et l'environnement, et finit par se stabiliser vers l'âge de 3 ans<sup>371</sup>. A l'âge adulte, le microbiote intestinal va être propre à chaque individu qualitativement et quantitativement, mais l'ensemble des individus va posséder une base commune d'espèces de bactéries. Toutefois, une étude a révélé des spécificités dans la composition du microbiote intestinal selon les pays, indiquant que les facteurs environnementaux (alimentation, génétique etc.) peuvent également l'affecter<sup>372</sup>. La caractérisation de la composition du microbiote intestinal par les technologies de séquençage de l'ARN 16S a révélé que celui-ci est majoritairement composé de bactéries anaérobies divisées en 5 phyla bactériens : les *Firmicutes*, les *Bacteroidetes*, les *Actinobacteria*, les *Proteobacteria* et les *Verrucomicrobia*. Toutefois, avec l'avancée des technologies, de nouveaux phylotypes sont découverts et restent à découvrir, mettant en lumière la complexité du microbiote intestinal et menant certains chercheurs à le considérer comme un « organe métabolique » à part entière<sup>373 374</sup>.

Le microbiote intestinal interagit avec l'ensemble de l'organisme par plusieurs voies possibles impliquant des acteurs cellulaires ou moléculaires différents : la voie humorale/métabolique, endocrinienne, nerveuse et immunitaire (**Figure 19**). En effet, les bactéries commensales sont capables de générer des molécules de type acide gras à chaîne courte (SCFA), acides aminés (tryptophane) et neurotransmetteurs (dont la sérotonine, la dopamine et les catécholamines) qui peuvent agir localement sur la barrière épithéliale intestinale ou sur les cellules du SI par exemple, et à distance, via la circulation

sanguine ou l'interaction avec les neurones du système nerveux entérique<sup>375</sup>. Dans cette partie, nous allons nous intéresser à la voie de communication entre le microbiote et le SI, et son impact dans le développement de pathologies.



**Figure 19: Les différentes voies de communication entre le microbiote intestinal et l'organisme.**

Il existe différentes voies de communication entre le microbiote intestinal et l'organisme, passant par :

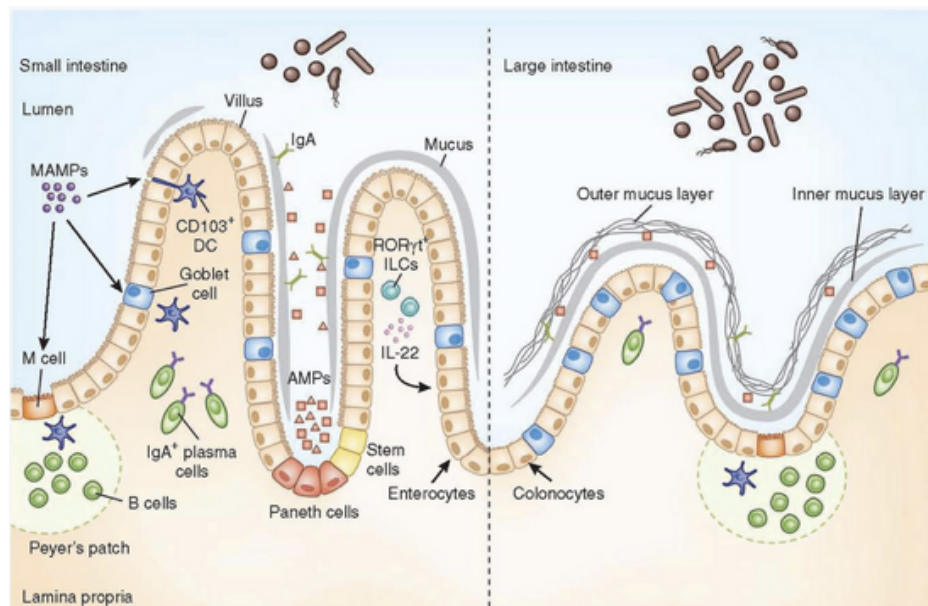
- i) la voie nerveuse avec le système nerveux entérique mais également la sécrétion de neurotransmetteurs par le microbiote,
- ii) la voie humorale/métabolique qui représente l'ensemble des métabolites produits par le microbiote et qui agit localement mais également en périphérie via la circulation sanguine,
- iii) la voie du système immunitaire dont les propriétés sont impactées par le microbiote intestinal.

### A) Communication entre le microbiote et le SI au niveau des GALT

En condition physiologique, l'interaction entre les cellules immunitaires et le microbiote intestinal est compartimentalisée, séparée par une couche de cellules épithéliales située entre la lumière intestinale et les tissus sous-jacents, sur lesquels se trouve une couche de mucus dense empêchant la pénétration des bactéries dans les tissus. Les cellules épithéliales intestinales (CEI) vont jouer un rôle d'intermédiaire entre le microbiote et les cellules du SI. En effet, les CEI sont capables de produire diverses cytokines et chimiokines en réponse aux stimuli des bactéries commensales, ce qui va moduler le développement du SI intestinal. En retour, les CEI vont également recevoir des signaux de la part des cellules du SI, via la sécrétion de cytokines, ce qui va modifier leur production de diverses molécules (peptides antibactériens, hormones, cytokines etc.), afin de prévenir l'attachement et l'infiltration des bactéries dans le tissu intestinal. La communication entre les cellules du SI et le microbiote est donc bidirectionnelle et va principalement impliquer la sécrétion de molécules solubles. Il existe plusieurs sous-types de CEI, comprenant les entérocytes, les cellules en gobelet ou calciformes, les cellules de Paneth, les cellules M et les cellules souches épithéliales. Le type de cellules épithéliales le plus abondant au niveau de l'intestin grêle sont les entérocytes, et au niveau du gros intestin, les colonocytes.

Ces cellules sont reliées entre elles par des jonctions serrées, permettant de contrôler la perméabilité de la barrière épithéliale et sont capables de sécréter des molécules antimicrobiennes. Les cellules en gobelet sont spécialisées dans la production de mucus et peuvent également produire des molécules anti-inflammatoires pour favoriser la réparation de l'épithélium. Les cellules de Paneth se situent au niveau de la région basale des cryptes de l'intestin grêle seulement, avec les cellules souches épithéliales, et sont spécialisées dans la production de molécules antimicrobiennes telles que l' $\alpha$ -defensine, RegIII $\gamma$  (regenerating islet-derived protein 3), le lysozyme et des phospholipases sécrétées (sPLA2). Les protéines antibactériennes sécrétées par l'épithélium, sous le contrôle des TLR (Toll-like receptor), vont participer à limiter la pénétration bactérienne dans la couche de mucus de l'intestin grêle. Enfin, les cellules M résident au niveau des tissus lymphoïdes (plaques de Peyer et ILF). Leur fonction principale est d'absorber les antigènes de la lumière intestinale et de les livrer aux APC présentes au niveau de structures en « poche » du côté basal afin d'assurer l'activation des cellules du SI et l'immuno-surveillance. Les cellules M peuvent également constituer la porte d'entrée pour les pathogènes dans le tissu intestinal<sup>376</sup> (**Figure 20**).

Les études qui ont permis de mettre en évidence la relation entre le système immunitaire et le microbiote se sont basées sur des modèles de souris dépourvues de germes, « germ-free » (GF). Ces souris vont être élevées dans des conditions stériles afin de contrôler leur exposition aux micro-organismes et permettent des études impliquant l'absence de microbiote ou la modulation de la composition de celui-ci. Chez ces souris, il a été montré un défaut de l'architecture des tissus lymphoïdes associés à l'intestin et une altération de la réponse immunitaire<sup>377</sup>. L'absence de toutes bactéries commensales chez les souris GF n'induit pas une absence de développement des GALT incluant les plaques de Peyer (PP), les ILF, les crypto-plaques et les LN mésentériques (mLN), mais une réduction de la taille des PP et des GC. En outre, la reconstitution du microbiote chez une souris GF permet de restaurer l'organisation des GALT (taille, présence de centres germinatifs, maturation des ILF). Tout comme les PP, la maturation des ILF et des crypto-plaques nécessite la présence du microbiote intestinal puisqu'elle est incomplète chez des souris déficientes en PRR (pattern recognition receptors)<sup>378</sup>. La reconnaissance PRR-PAMP (pathogen-associated molecular patterns) va promouvoir le développement des GALT mais également moduler la fonction du SI. En outre, le microbiote va réguler le développement préférentiel de certaines populations de lymphocytes dans l'intestin mais aussi participer à la réparation de la barrière épithéliale.



**Figure 20: Organisation de la barrière intestinale de l'intestin grêle et du gros intestin, d'après Brown et al., 2013<sup>379</sup>.**

Le microbiote intestinal est confiné anatomiquement grâce à la monocouche de mucus produite par les cellules en gobelet dans l'intestin grêle ou la bicouche de mucus au niveau du gros intestin. Les entérocytes de l'intestin grêle et les colonocytes du gros intestin sont reliés entre eux par des jonctions serrées formant ainsi une barrière protectrice peu perméable. Les cellules de paneth sont enrichies au niveau des cryptes et sécrètent des peptides antimicrobiens (AMPs). Au niveau des PP, les cellules M vont absorber les antigènes qui vont pouvoir par la suite être présentés par les DC. Les DC peuvent également récolter les antigènes directement par prélèvement luminal trans-épithéliale.

### a. Relation microbiote et cellules de l'immunité innée

#### Les macrophages et les DC

De par leur capacité de phagocytose, d'endocytose et de micropinocytose, les macrophages et les DC, situés dans la lamina propria, vont favoriser l'immunotolérance des bactéries commensales qui traversent la barrière épithéliale, permettant ainsi le maintien de l'homéostasie intestinale<sup>380</sup>. En effet, il a été montré que les cellules phagocytaires résidant dans l'intestin, incluant les macrophages et les DC, sont hypo-réactifs vis-à-vis des bactéries commensales. Bien que les macrophages intestinaux dérivent des monocytes sanguins, ils ont un phénotype et une fonction bien distincts, avec une forte capacité de phagocytose qui n'induit pas pour autant une sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-1, IL-6, TNF $\alpha$ ) comparées aux monocytes sanguins<sup>381</sup>. De même, les macrophages intestinaux ont une expression plus faible des récepteurs de la réponse innée incluant le récepteur au LPS, le CD14. Par ailleurs, les DC intestinales vont davantage promouvoir la différenciation des LT CD4 naïfs en Treg. En effet, une étude a révélé que les DC CD103+, isolés de mLN, induisent le développement de iTreg à partir de LT CD4 naïfs, *in vitro*, de façon dépendante du TGF- $\beta$  et de l'acide rétinoïque (RA), métabolite issu de la vitamine A<sup>382</sup>. De plus, une étude a montré que des peptides sécrétés par *Lactobacillus plastarum* induisent la production d'IL-10 par les DC intestinales, *in vitro*<sup>383</sup>. De nombreuses bactéries

ou peptides sécrétés par celles-ci vont impacter la maturation des DC et moduler la réponse des cellules immunitaires innées ainsi que les populations de LT CD4 générés. Il a notamment été montré que le LPS ou la flagelline vont induire des signaux à travers la voie d'activation des TLR chez les DC (CD103+CD11b+) qui vont en retour sécréter de l'IL23. Cette cytokine va favoriser la sécrétion d'IL-22 par les ILC3 qui va, à son tour, induire la production de RegIII $\gamma$  par les CEI<sup>384 385</sup>.

L'hypo-réactivité des macrophages et DC intestinaux, via leur expression réduite de cytokines inflammatoires et récepteurs de l'immunité innée permet de contrôler l'inflammation dans les tissus à l'état physiologique, malgré la proximité avec des bactéries immunostimulantes. Cependant, certaines bactéries vont également favoriser le développement d'une réponse inflammatoire. En effet, la bactérie *Bifidobacterium spp.* est capable de générer des DC matures qui vont préférentiellement sécréter les cytokines polarisantes en effecteurs Th17 ou Th1 *in vitro*<sup>386</sup>.

### ILC (innate lymphoid cells)

Les ILC font partie d'une population de cellules innées effectrices qui ne possèdent pas de récepteur spécifique aux antigènes, contrairement aux LT et LB, mais présentent des similitudes avec les populations de LT CD4 par l'expression de certains facteurs de transcription ainsi que la sécrétion de cytokines. L'une des populations d'ILC, les ILC3, est particulièrement abondante au niveau des tissus intestinaux. Les ILC3, sécrétrices d'IL-22, vont participer à la survie et à la prolifération des CEI ainsi qu'à leur production de peptides antimicrobiens<sup>387</sup>. En effet, des études sur des souris déficientes en IL-22 ou déficientes en ILC sécrétant de l'IL22 ont montré une diminution de la production de peptides antimicrobiens tels que RegIII $\beta$  et RegIII $\gamma$ , favorisant ainsi la dissémination et la surreprésentation d'espèces bactériennes pathogènes<sup>388 389</sup>. Les protéines RegIII ciblent spécifiquement les bactéries à Gram positif en se liant sur la couche peptidoglycane, à leur surface, induisant leur élimination *in vitro*. Il est à noter que seul RegIII $\gamma$  et RegIII $\alpha$  ont été trouvés chez l'homme. Par ailleurs, l'IL-22 sécrétée par les ILC3 est également impliquée dans l'expression de la fucosyltransferase 2 par les CEI, enzymes responsables de l'ajout de sucre dans les protéines constituant du mucus, permettant ainsi de renforcer l'intégrité de la muqueuse et de la barrière intestinale<sup>390</sup>. De plus, il a été montré que les ILC3 expriment le CMHII, et que la délétion spécifique du CMHII sur ces cellules entraîne une inflammation intestinale spontanée dépendant des LT CD4, suggérant que la présentation des bactéries commensales aux LT CD4 par les ILC3 participe à l'induction de la tolérance. En outre, les ILC3 CMHII+ ont la capacité d'induire directement la mort des LT activés spécifiques des bactéries commensales, modulant ainsi la réponse immunitaire au sein de l'intestin<sup>391</sup>.



La relation entre le microbiote intestinal et le SI innée est dynamique et bidirectionnelle, faisant intervenir différents acteurs au sein du tissu.

## **b. Relation microbiote et cellules de l'immunité adaptative**

Les cellules immunitaires présentes au niveau des GALT et de la lamina propria vont être constamment en relation avec le microbiote intestinal, ce qui va impacter la réponse immunitaire au sein du tissu afin de contrôler l'inflammation. Le SI va, en retour, contrôler la composition du microbiote afin de maintenir un état d'homéostasie (**Figure 21**).

### Les lymphocytes T CD4

#### **Th1**

La colonisation par un spectre large de bactéries chez les souris dont le microbiote est contrôlé induit le développement de Th1 et Th17 pro-inflammatoires, indiquant que certaines bactéries ont la capacité de moduler la réponse LT. Dans les cas des Th1, il a notamment été montré que les souris conventionnelles, avec un microbiote contrôlé, ou monocolonisées avec la bactérie SFB (*segmented filamentous bacteria*), présentent une augmentation de l'ARNm de l'IFN $\gamma$  et d'IL-1 $\beta$  en faveur d'un phénotype Th1 au niveau de la lamina propria, de l'iléum et du colon<sup>392</sup>.

#### **Th17**

Chez les souris GF, il a été montré une diminution de la fréquence de Th17 au niveau des GALT. Ce résultat est également obtenu lorsque les souris sont traitées avec des antibiotiques montrant l'implication du microbiote dans la génération de Th17 dans les GALT<sup>393</sup>. La reconstitution du microbiote chez les souris GF va permettre un développement de Th17 dans l'intestin. En outre, l'ajout de la bactérie SFB chez les souris GF induit la génération de Th17<sup>394</sup> via la production de SAA (serum amyloid A protein) par les cellules épithéliales. Le SAA va promouvoir la production d'IL-23 et d'IL-6 par les DC présents dans la lamina propria, cytokines responsables de la polarisation en Th17<sup>395</sup>. Les Th17 peuvent également, en retour, limiter l'expansion de bactéries SFB par leur production de peptides antimicrobiens ainsi que par la production des ROS.

#### **Treg**

En condition physiologique, les Treg vont s'accumuler dans l'intestin afin de réguler l'inflammation induite par les bactéries commensales. Chez les souris traitées avec des antibiotiques ou chez les souris GF, le nombre de Treg diminue fortement, indiquant que le microbiote participe à leur différenciation et/ou à leur maintien<sup>396</sup>. Toutefois, une étude a montré qu'en absence de microbiote, le

nombre de Treg diminue au niveau du colon, mais pas au niveau de l'intestin grêle, ni des mLN, suggérant que la colonisation de bactéries spécifiques au niveau du colon favorise particulièrement les Treg<sup>397</sup>. De nombreuses bactéries commensales vont être impliquées dans la polarisation des LT CD4 en Treg à la fois dans la lamina propria de l'intestin grêle et du colon. La colonisation de bactéries spécifiques chez les souris GF induit la différenciation en Treg dans le colon mais pas dans l'intestin grêle, confirmant une différence entre ces deux compartiments<sup>398</sup>. Le transfert adoptif de LT CD4 en l'absence de Treg provoque une colite, inflammation de la muqueuse du colon causant des troubles intestinaux, ce qui n'est pas observé en présence de Treg<sup>399</sup>. Il a en outre été montré que les SCFA produites par les bactéries, notamment le butyrate, vont participer à la différenciation des LT CD4 en Th1, mais également en Treg, en stimulant la production de TGF- $\beta$  par les DC (CD103+)<sup>400</sup>. De plus, la colonisation des souris GF par *B. fragilis*, faisant partie de l'espèce *Bactéroïdes*, induit via la sécrétion de PSA (polysaccharide A), le développement de iTreg sécréteurs d'IL-10. Le PSA, par la stimulation des voies de signalisation du TLR2 sur les LT CD4, va donc promouvoir la tolérance immunitaire dans des conditions d'homéostasie, mais également dans des conditions inflammatoires en participant à l'inhibition de la différenciation des Th17<sup>401 402</sup>.

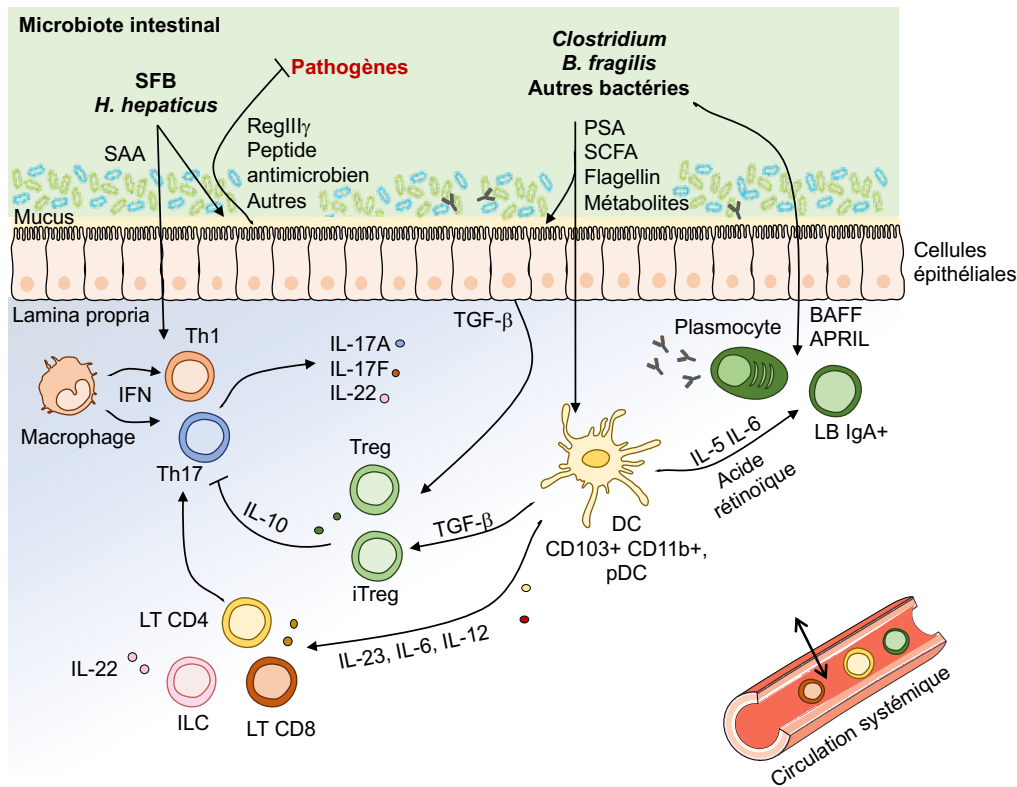
## Les lymphocytes T CD8

Le microbiote intestinal va également réguler la réponse des LT CD8 cytotoxiques dont les fonctions d'élimination des agents pathogènes sont essentielles. Une étude a montré que le transfert de LT CD8 activés et spécifiques d'un antigène, chez des souris GF, n'aboutit pas au développement en LT mémoires et échoue dans la génération d'effecteurs secondaires. En effet, le microbiote et les métabolites associés, tels que les SCFA, vont promouvoir la différenciation en LT CD8 effecteurs ayant une capacité de réponse plus élevée lors d'une deuxième rencontre avec l'antigène via la modification du métabolisme de ces cellules<sup>403</sup>. En outre, il a été également observé la présence de LT CD8 régulateurs au niveau de la lamina propria chez les donneurs sains. Il a été proposé que l'induction de cette population régulatrice (CD8+CD28-) dépende de l'interaction des LT CD8 avec les CEI<sup>404</sup>. La relation entre microbiote et LT CD8 reste encore à déterminer plus précisément.

## LB et plasmocytes

Les LB et les plasmocytes jouent un rôle essentiel dans la régulation du microbiote intestinal. En effet, les bactéries commensales vont induire la production d'IL-10 par les LB via les voies de signalisation du TLR2, permettant de réduire l'activation des LT et de maintenir l'homéostasie intestinale<sup>405</sup>. Par ailleurs, les IgA sous forme polymérique sont produites en grande quantité au niveau de la lumière intestinale<sup>406</sup> et sont transportées par les récepteurs pIgR (polymeric immunoglobulin receptor) exprimés par les CEI<sup>407</sup>. Les IgA ainsi sécrétées (sIgA) vont interagir avec les bactéries commensales et les antigènes afin d'inhiber leur attachement à l'épithélium et ainsi éviter leur entrée

dans la lamina propria. L'absence ou la mutation de l'enzyme AID induisant un déficit des IgA va participer à l'altération de la composition du microbiote<sup>408</sup>. Les raisons de l'induction de la production d'IgA par les LB sont peu connues. Toutefois, il a été montré que la flagelline est capable de promouvoir la synthèse de RA par les DC, ce qui va favoriser la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'IgA<sup>409</sup>. Des recherches ont montré que les DC jouent un rôle important dans la différenciation des LB en plasmocytes sécréteurs d'IgA via leur expression de RA, mais également de BAFF (B-cell activating factor) et APRIL (proliferating-inducing ligand)<sup>410</sup>. Inversement, l'interaction des sIgA avec la flagelline va induire une diminution des gènes associés à son expression, ce qui va permettre de contrôler la réponse inflammatoire envers cette bactérie. Chez l'homme et chez la souris, la fréquence d'hypermutations somatiques des IgA augmente avec l'âge. La modification de la composition et de la complexité du microbiote intestinal induit une augmentation de la diversification du répertoire d'IgA intestinaux. De façon intéressante, les clones de LB présents lors d'une mono-colonisation bactérienne chez une souris persistent après colonisation avec un microbiote plus varié<sup>411</sup>. En accord avec ces données, les patients souffrants de déficience en IgA ont un risque plus élevé de développer une maladie cœliaque ou des MAI<sup>412</sup>.



**Figure 21: Le système immunitaire et le microbiote s'influencent mutuellement afin de conserver l'homéostasie au sein du tissu intestinal, inspiré de Kamada et al., 2013.**

La modulation de la composition du microbiote intestinal par le SI, ainsi que l'impact du microbiote sur la réponse du SI, font appel à de multiples interactions dynamiques. Les bactéries commensales telles que SFB et *B. fragilis* vont activer les DC et les macrophages de la lamina propria qui vont induire la différenciation en Th inflammatoires via la sécrétion d'IL-23, IL-6 ou IL-12 par les APC, mais également des Treg, via la sécrétion de TGF- $\beta$ . Ces bactéries commensales peuvent également stimuler directement les CEI, ce qui va favoriser le développement de Treg mais également produire des peptides antimicrobiens directement dans la lumière intestinale. Le microbiote et les DC vont également stimuler la différenciation des LB en plasmocytes sécrétant d'IgA. Les IgA vont traverser la barrière épithéliale et empêcher l'adhésion des bactéries à celle-ci. L'activation des TLR des CEI va également induire la sécrétion de BAFF et APRIL permettant la survie des LB dans la lamina propria, BAFF et APRIL sont également sécrétés par les DC.

## B) Génération du « gut homing »

Les lymphocytes migrent continuellement au sein de l'organisme permettant ainsi d'optimiser leur rencontre avec l'antigène. Ils vont circuler dans le sang et se diriger vers les SLO, mais également être recrutés au niveau des sites d'inflammation dans les tissus. La migration est un processus contrôlé qui implique l'expression de **molécules de « homing »** ou d'adressage sur les cellules du SI, mais également l'expression de ligands spécifiques sur les cellules endothéliales des vaisseaux. Les molécules impliquées dans les processus de migration font partie de la famille des sélectines, intégrines et des récepteurs aux chimiokines. Une fois les LT CD4 naïfs activés par la rencontre avec l'antigène, les LT CD4 vont modifier leur profil d'expression de molécules d'adressage afin de pouvoir migrer dans différents sites en périphérie.

Les lymphocytes impliqués dans la réponse immunitaire intestinale se trouvent au niveau de sites inducteurs (mLN et PP) et au niveau de la lamina propria, site effecteur. Dans l'intestin, les lymphocytes naïfs qui arrivent au niveau des mLN et des PP vont être activés et leur profil d'expression de molécule de homing va être modifié, afin de leur permettre de retourner dans l'intestin, au niveau des sites effecteurs. Dans les GALT, l'adressage des lymphocytes va être sous la dépendance de l'**intégrine  $\alpha 4\beta 7$**  et du récepteur aux chimiokines **CCR9**, alors que la rétention des lymphocytes au sein du tissu va dépendre de l'expression de l'**intégrine  $\alpha E\beta 7$** . L'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  se lie à MadCAM-1 (mucosal addressin cell adhesion molecule 1) préférentiellement exprimés sur les HEV des PP, des mLN et par les veinules post-capillaires de la lamina propria de l'intestin grêle et du gros intestin, alors que CCL25, le ligand de CCR9, est sécrété par les CEI et les cellules endothéliales des vénules de la lamina propria de l'intestin grêle. L'intégrine  $\alpha E\beta 7$  va faciliter la rétention des lymphocytes effecteurs dans le tissu intestinal par son interaction avec la E-cadhérine exprimée par les CEI<sup>413</sup>. Il a été montré que l'adhésion des lymphocytes  $\alpha E\beta 7+$  aux cellules épithéliales est favorisée par CCL25, suggérant que l'expression de CCR9 pourrait faciliter l'arrivée de ces cellules au niveau des CEI, et que l'induction de l'intégrine  $\alpha E\beta 7$  pourrait être secondaire à leur entrée dans l'épithélium de l'intestin grêle<sup>414</sup>. Il a également proposé que les lymphocytes exprimant l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  se différencient en lymphocytes exprimant l'intégrine  $\alpha E\beta 7$  dans l'intestin. Cette hypothèse est soutenue par le fait que le TGF- $\beta$ , sécrété notamment par les CEI, induit l'augmentation de l'expression des transcrits des sous-unités  $\alpha E$  et  $\beta 7$ , ainsi que l'expression de l'intégrine  $\alpha E\beta 7$  à la surface des LT accompagnée par une diminution des ARNm de la sous-unité  $\alpha 4$ <sup>415</sup>.

De nombreux travaux ont permis de soutenir le rôle de l'intégrine  $\beta 7$  et de CCR9 dans l'adressage intestinal. En effet, des études ont montré que des souris déficientes en intégrine  $\beta 7$  ont un défaut de formation des tissus lymphoïdes le long du tractus gastro-intestinal, accompagné d'un déficit en LT et LB dans ces tissus<sup>416</sup>. En outre, il a été montré que les cellules déficientes en intégrine  $\beta 7$  ne peuvent pas entrer dans l'intestin<sup>417</sup>. Par ailleurs, l'utilisation d'anticorps anti- $\alpha 4$  et anti- $\beta 7$  chez la souris réduit le nombre de lymphocytes dans les intestins par l'inhibition de l'interaction avec MadCAM-1<sup>418</sup>. Par ailleurs, une étude a révélé que des LT CD4 mémoires (CD45RA-) exprimant l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  à un haut niveau dans la circulation sanguine possèdent une plus forte réactivité au rotavirus, virus infectant le tube digestif et causant des gastro-entérite infantile, comparés aux LT CD4 mémoires qui n'expriment pas l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ . Ces résultats montrent d'une part, qu'une infection avec un pathogène entérique peut induire la génération de LT CD4 mémoires circulants spécifiques à l'antigène et limité au compartiment  $\alpha 4\beta 7$  ; et d'autre part, que les LT CD4 mémoires spécifiques d'un antigène intestinal peuvent être identifiés par l'expression de cette intégrine<sup>419</sup>.

L'adressage des cellules immunitaire au niveau de l'intestin grêle via l'axe CCR9/CCL25 a fait l'objet de nombreuses études. En effet, le CCR9 est exprimé à un haut niveau par les cellules immunitaires présentes dans l'intestin grêle chez l'homme. Contrairement à l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , peu de cellules expriment le CCR9 au niveau du colon et le niveau d'expression est plus faible que dans l'intestin grêle<sup>420</sup>, ce qui concorde avec l'absence de l'expression de CCL25 au niveau du colon<sup>421</sup>. En effet, des travaux sur des souris déficientes en CCR9 ou en induisant le blocage de CCL25 ont montré une diminution du nombre de lymphocytes dans l'intestin grêle, mais pas dans le colon. En outre, chez la souris, la réduction spécifique de la réponse chimiotactique au CCL25 des cellules de la MO induit une altération de la formation des crypto-plaques et une diminution des lymphocytes au niveau de l'épithélium intestinal, sans impacter le développement du compartiment thymique, splénique et ganglionnaire<sup>422</sup>.

Une autre molécule a été montrée comme impliquée dans l'adressage des lymphocytes uniquement dans le colon : le **GPR15** (orphan G-protein-coupled receptor 15). Une étude transcriptomique a révélé que chez l'homme et la souris les LT dans le colon expriment préférentiellement GPR15 comparés aux autres tissus<sup>423</sup>. De plus, des LT transduits avec GPR15 vont se localiser au niveau du colon suggérant que GPR15 est important pour l'accumulation de LT effecteurs dans le gros intestin. Par ailleurs, des souris déficientes en GPR15 développent des inflammations plus sévères du colon, qui ne persistent pas lors du transfert de Treg GPR15<sup>+</sup><sup>424</sup>. L'expression de GPR15 est modulée par le microbiote, le TGF- $\beta$  mais pas par l'acide rétinoïque. Toutefois, l'implication de ce récepteur reste encore à déterminer puisque l'expression de GPR15 et sa fonction ne sont pas limitées au trafic des LT vers le colon. En effet, il a été montré dans un modèle d'inflammation de la peau la présence de l'ARNm de GPR15 et de son ligand GPR15-L, au niveau de la peau<sup>425</sup>. Chez l'homme, GPR15 est fortement exprimé par les LT effecteurs du colon, particulièrement les Th2, mais n'est pas exprimé sur les Treg (FOXP3<sup>high</sup>) résidant dans le colon<sup>426</sup>.

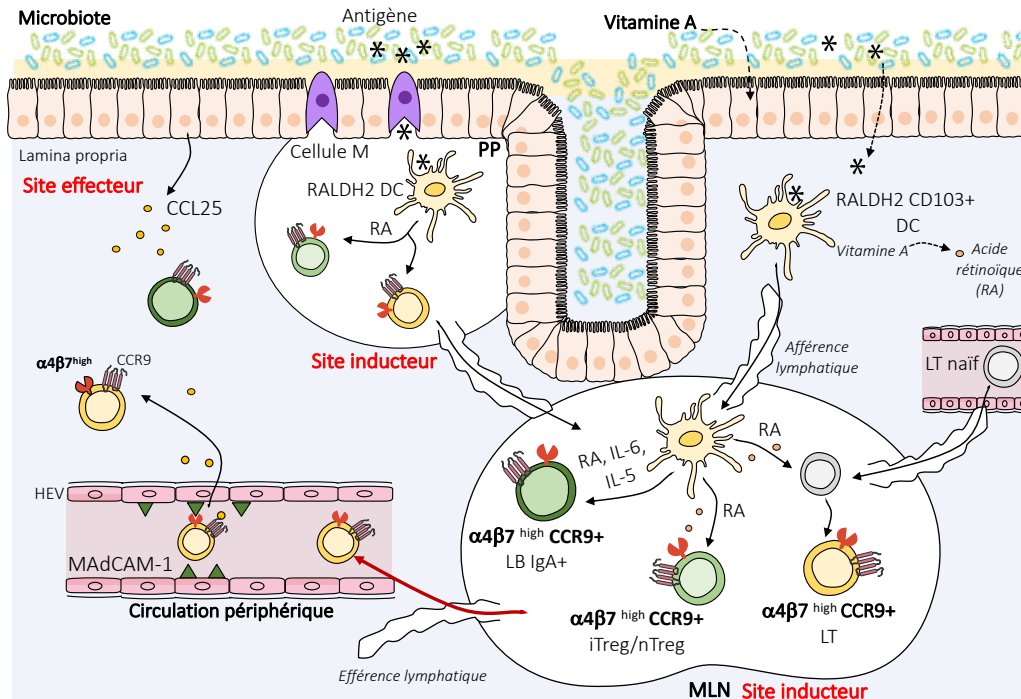
### Rôle des DC dans la génération du « gut homing »

Dans des conditions physiologiques, les LT naïfs expriment l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  à un faible niveau ainsi que CD62L, permettant leur migration dans les ganglions lymphatiques périphériques dont les mLN mais également dans les PP. La sécrétion de CCL19 et CCL21 par les HEV va également contribuer à leur migration via l'expression de CCR7, permettant aux LT naïfs de pouvoir « rouler » au niveau des HEV et de s'attacher via l'interaction  $\alpha 4\beta 7$ /MadCAM-1. L'interaction entre CCR7 sur les LT naïfs et CCL21 exprimés par les HEV va permettre d'activer les LT naïfs et induire le regroupement des intégrines. L'activation de l'intégrine LFA-1 ou intégrine  $\alpha L\beta 2$  va participer à l'arrêt ferme des LT

naïfs, en complément avec l'interaction  $\alpha 4\beta 7$ /MadCAM-1. L'activation de ces intégrines va induire l'adhésion des LT naïfs et leur migration à travers les HEV dans le parenchyme des mLN ou des PP<sup>427</sup>.

Une fois dans les PP ou les mLN, les LT naïfs vont ensuite être activés par leur interaction avec les DC, via le complexe CMH-peptide, induisant leur prolifération et leur différenciation. Au niveau de l'intestin grêle, l'activation par les DC des PP ou des mLN s'accompagne d'une augmentation rapide et sélective de l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et de CCR9 par les LT activés (**Figure 22**). Des études ont pu montrer que le mécanisme de cette induction de l'expression des marqueurs intestinaux par les DC implique le métabolisme de la vitamine A. En effet, les DC intestinales expriment très fortement la RALDH2 (retinal deshydrogenase 2), enzyme nécessaire à la génération de RA à partir de la vitamine A, issue de l'alimentation, contrairement aux DC de la peau ou de la rate<sup>428</sup>. Parmi les enzymes de la famille des RALDH, la RALDH2 est l'enzyme prédominante exprimée par les DC CD103+ dans l'intestin, les mLN et les PP. Cette enzyme n'est pas exprimée par les DC CD103- intestinales, ni par les DC spléniques, ou par la très grande majorité des DC dans les LN périphériques<sup>429</sup> qui ne sont pas capable d'induire l'expression de marqueurs intestinaux (intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et CCR9)<sup>430</sup>. De plus, les DC CD103+ présentes dans les mLN et l'intestin grêle ont une capacité spécifique d'induction du CCR9 comparées à d'autres DC CD103+ présentes dans d'autres muqueuses comme les poumons<sup>430</sup>. Les souris déficientes en vitamine A ont une expression diminuée de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  sur les LT effecteurs, et un nombre réduit de lymphocytes dans la lamina propria, sans impact sur l'expression des marqueurs d'adressage à la peau, ni du nombre de LT présents dans les autres compartiments (poumon et foie). En outre, l'ajout de RA à des cultures de LT CD4 naïfs pré-activés est suffisant pour entraîner une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et de CCR9 *in vitro*, et l'inhibition de la RALDH inhibe l'induction de l'expression de ces marqueurs par les DC. Une forte concentration de vitamines A induit, via les DC CD103+, la co-expression de CCR9 et de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , mais l'expression de ces molécules n'est pas toujours liée. En outre, les DC du colon sont capables d'induire l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  mais pas du CCR9, ce qui pourrait s'expliquer par la présence d'un plus faible taux de vitamines A dans ce tissu<sup>431</sup>, ce qui est en adéquation avec l'absence du ligand de CCR9 dans le colon.

La forte expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , tout comme celle de CCR9, va permettre aux lymphocytes, une fois dans la circulation sanguine, de revenir préférentiellement dans l'intestin (lamina propria, mLN et PP).



**Figure 22 : Mécanismes d'induction des marqueurs intestinaux au niveau des GALT, inspiré par Coombes et Powrie, 2008<sup>432</sup>.**

Les DC CD103<sup>+</sup> intestinales, via l'enzyme RALDH2 qui transforme la vitamine A en RA, va conduire à l'augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et CCR9 par les lymphocytes au niveau des mLN et PP, correspondant aux sites inducteurs. Les lymphocytes vont ensuite sortir des GALT dans la circulation périphérique, via les efférences lymphatiques, et revenir au niveau de la lamina propria via l'interaction intégrine  $\alpha 4\beta 7$ /MadCAM-1 présents sur les HEV de l'intestin et CCR9/CCL25 sécrétées par les CEI.

## II. Lymphocytes intestinaux : acteurs des MAI ?

Le déséquilibre du microbiote intestinal ou dysbiose par notamment des perturbations environnementales (antibiotiques, alimentation, géographie, stress etc.), peut conduire à une altération de l'interface hôte-microbes favorisant la dissémination systémique des micro-organismes commensaux, l'établissement d'agents pathogènes au sein de la flore intestinale, mais également participer au développement d'une réponse du SI aberrante. Les cellules immunitaires au niveau des GALT, se situant le long du tractus gastro-intestinal, vont jouer un rôle crucial dans le maintien de cet l'équilibre en condition physiologique, mais peuvent également être impliquées dans le développement de pathologies. Cette altération de la réponse immunitaires induite par la perturbation du microbiote intestinal pourrait participer au développement de diverses maladies locales et systémiques comme l'obésité, le cancer, l'autisme ainsi que certaines MAI (**Figure 23**).



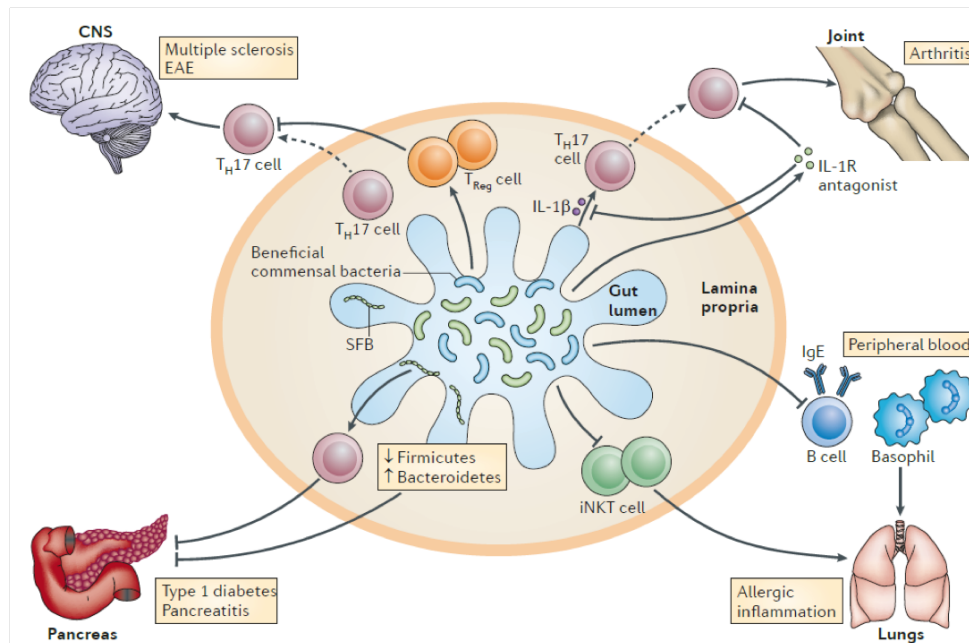
## Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD)

Les IBD, incluant la maladie de Crohn (CD) et la rectocolite hémorragique (RCH), sont des MAI définies par une inflammation chronique de la paroi du tube digestif, préférentiellement au niveau de l'intestin pour la maladie de Crohn et du colon pour la rectocolite hémorragique. Une augmentation de MadCAM-1 a été observée dans les tissus inflammatoires des patients CD et RCH associée à une augmentation du nombre de LT intégrine  $\alpha4\beta7$  comparés à des tissus sains<sup>433</sup>. En outre, chez des souris CD déficientes en intégrine  $\beta7$ , il a été montré une inhibition de l'inflammation intestinale. L'utilisation d'anticorps anti- $\beta7$  et MadCAM-1 réduit l'inflammation chez les souris où la RCH a été induite<sup>434</sup>. De même, les patients CD présentent une augmentation de l'expression de CCL25 au niveau de l'intestin grêle mais pas du colon<sup>421</sup>. Une étude révèle que le nombre de lymphocytes CCR9+ augmente dans la circulation sanguine chez les patients CD avec atteinte de l'intestin grêle et maladie cœliaque, mais pas dans les CD avec inflammation du colon uniquement<sup>421</sup>. Au vu de l'implication des lymphocytes intestinaux dans l'inflammation chronique des patients IBD, un anticorps monoclonal anti- $\alpha4\beta7$ , le Vedolizumab, a été développé visant à empêcher la migration des lymphocytes  $\alpha4\beta7$  dans l'intestin et provoquer leur rétention dans la circulation sanguine. Ce traitement montre des résultats intéressants chez les patients CD et RCH, avec une augmentation des rémissions par rapport à un placebo ou autres traitements<sup>435</sup>.

## Polyarthrite rhumatoïde (PAR)

La PAR est une maladie auto-immune qui affecte les articulations en premier lieu mais également d'autres parties du corps comme les poumons ou le cœur. Elle est caractérisée par la présence d'auto-anticorps responsables de la destruction de la membrane synoviale des articulations. Une étude comparant 98 patients PAR et 80 sujets sains a révélé que le microbiote intestinal est altéré chez les patients PAR<sup>436</sup>. En effet, les patients PAR présentent une surreprésentation des *Lactobacillus salivarius* qui est corrélée à la gravité de la maladie. Des recherches ont montré une réduction des symptômes de la PAR chez les souris GF, ainsi qu'une forte inhibition du développement de la maladie dans les modèles murins de PAR traités avec des antibiotiques<sup>437</sup>. En outre, la concentration d'IL-1 $\beta$  est élevée dans le plasma et le liquide synovial des patients PAR, et est corrélée à l'activité de la maladie<sup>438</sup>. Il a été montré que les souris déficientes pour un antagoniste naturel au récepteur à l'IL-1 (IL-1rn<sup>-/-</sup>) développent spontanément une PAR, causée par l'excès de la signalisation de l'IL-1, tandis que les souris GF IL-1rn<sup>-/-</sup> ne développent pas la maladie. La monocolonisation des souris GF par *Lactobacillus bifidus* restaure la susceptibilité à la maladie suggérant que la production d'IL-1 $\beta$  peut être initiée par la reconnaissance de la flore microbienne et provoquer l'apparition de la PAR<sup>439</sup>. Par ailleurs, la colonisation des souris GF par la bactérie SFB induit la génération de Th17 intestinaux qui vont être capables de migrer dans la rate mais également être associés à une élévation du taux d'auto-anticorps dans la circulation<sup>437</sup>. De même, il a été montré dans le modèle de souris de la PAR que la bactérie SFB

est capable de favoriser la différenciation des TFh au niveau des PP, mais pas de la rate, ni des ganglions lymphatiques poplités. La bactérie SFB favorise la différenciation des TFh en limitant l'accès de l'IL-2 par les LT CD4 conduisant à l'augmentation de l'expression de Bcl-6 dans les PP. Ces TFh induits par la bactérie SFB vont sortir des PP en direction des sites systémiques et participer à la réponse des TFh systémiques, ainsi qu'à la production d'auto-anticorps impliqués dans la PAR<sup>440</sup>.



**Figure 23: Le microbiote intestinal affecte les MAI extra-intestinales d'après Kamada et al., 2013.**

La composition du microbiote intestinal va impacter les propriétés des lymphocytes intestinaux qui vont pouvoir devenir des acteurs dans le développement de MAI. Il a été constaté dans de nombreuses MAI, une altération de la composition du microbiote intestinal, comparé à des sujets sains. Dans la PAR, la bactérie SFB va induire préférentiellement des Th17 et TFh conduisant à une augmentation de l'inflammation et de la production d'auto-anticorps. Dans le modèle de souris diabétiques non obèses, la diminution du rapport *Firmicutes/Bacteroidetes* est associée à un risque atténué de diabète de type 1. Il a été montré que les cellules Th17 induites par le SFB protègent l'hôte contre le développement du diabète de type 1. Dans les modèles murins d'allergies, il a été montré que les composés microbiens sont capables d'inhiber la production d'IgE par les LB périphériques, permettant de diminuer l'inflammation allergique des voies respiratoires. Dans le modèle EAE, il a été démontré que la colonisation de la bactérie SFB induit le développement de Th17 dans l'intestin mais également dans le SNC.

Les études sur l'implication du microbiote intestinal dans le développement des MAI restent encore à être approfondies. Toutefois, dans de nombreuses MAI, non présentées ici, il a été observé une altération de la composition du microbiote intestinal chez les patients (cas du diabète de type 1, de la SLE, SEP etc.) ce qui peut être un indicateur d'une altération de la réponse immunitaire intestinale. L'ensemble de ces données indiquent également que les lymphocytes intestinaux ne sont pas cantonnés au tractus gastro-intestinal et sont capables de migrer vers des sites en périphérie et organes cibles des MAI. Ainsi, dans le cas de la glomérulonéphrite à composante auto-immunitaire, les recherches ont montré que les Th17 générés dans l'intestin sont capables de migrer au niveau des reins et de participer à la pathologie<sup>441</sup>.

### III. Évidence de l'impact du microbiote et des LT dérivés de l'intestin dans la SEP

Chez les patients atteints de maladie neurologique non inflammatoire, des LT CD4 CCR9+ $\beta$ 7+ ont été détectés dans le LCR révélant ainsi la capacité de migration des LT d'origine intestinale<sup>442</sup>. Par ailleurs, les analyses de la composition du microbiote intestinal de 36 patients en phase RRMS et de 36 sujets sains ont révélées une dysbiose, avec une surreprésentation de bactéries faisant partie des *Firmicutes* (*Lactobacillus*, *Blautia*, *Dorea*) et *Bacteroidetes* (*Pedobacter*, *Parabacteroides*) chez les patients RRMS, comparés aux sujets sains. De façon intéressante, parmi les patients RRMS, ceux dans une phase active présentent un profil différent des patients RRMS en rémission<sup>443</sup>. Une autre étude réalisée également sur des patients RRMS a montré une différence dans la composition du microbiote comparés aux sujets sains. Les altérations du microbiote intestinal observées chez les patients méritent des études à plus grande échelle afin de déterminer la nature de ces modifications, au vu des différences inter-individuelles de composition du microbiote, ainsi que de l'impact des traitements sur sa composition<sup>444</sup>.

L'analyse sanguine de patients en phase SPMS a révélé la présence de LT CD4 mémoires CCR9+ ayant une expression de ROR $\gamma$ t spécifiquement augmentée, comparées aux LT CD4 mémoires CCR9+ de sujets sains. Cette population possède un phénotype plus inflammatoire (IL-17A et IFN $\gamma$ ) comparé aux LT CD4 mémoires CCR9-, ainsi qu'une capacité de migration plus élevée via l'augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, comparée aux LT CD4 mémoires CCR9+ de sujets sains<sup>445</sup>.

Les études chez les souris EAE dépourvues de microbiote intestinal (GF) ont montré une réduction de la sévérité de la maladie, associée à une diminution de la production d'IFN $\gamma$  et d'IL-17A par les LT CD4 et à une augmentation de la population des Treg au niveau de l'intestin mais également au niveau du SNC. La colonisation intestinale des souris EAE maintenues en condition GF par la bactérie SFB restaure la susceptibilité à l'EAE, montrant qu'une bactérie commensale peut affecter l'inflammation au niveau du SNC. L'ajout de SFB promeut la production d'IL-17 et d'IFN $\gamma$  dans l'intestin ainsi que dans le SNC. Le transfert de LT CD4 provenant de souris GF restimulés avec MOG induit l'EAE chez des souris receveuses pourvues de microbiote et dénuées de LT et LB matures (souris SPF Rag1<sup>-/-</sup>), ce qui montre la capacité de ces cellules à être activées mais également la régulation par le microbiote de ce statut inflammatoire<sup>446</sup>. L'ensemble de ces données met en évidence que les bactéries commensales peuvent affecter l'inflammation au niveau du SNC en jouant sur l'équilibre entre réponses pro et anti-inflammatoires. De plus, les souris RR qui ont reçu une transplantation fécale d'un jumeau homozygote ayant la SEP développe l'EAE à une fréquence plus importante que les souris qui ont été colonisées par des bactéries intestinales venant du jumeau sain, ce qui indique que le microbiote d'un patient SEP est suffisant pour précipiter le développement de l'EAE<sup>447</sup>. A l'inverse, d'autres travaux ont

révélé l'effet bénéfique de certaines bactéries sur le développement de l'EAE. En effet, *B. fragilis* capable d'induire la différenciation des LT CD4 en Treg, par la production de PSA, va inférer une résistance au développement de l'EAE.

Dans un modèle EAE immunisé par MOG, la fréquence de LT spécifiques de MOG augmente au niveau du colon au moment du pic de la maladie. Les Th17 spécifiques pour MOG sont présents au niveau du gros intestin suggérant l'activation des LT CD4 dans le colon durant l'EAE. L'utilisation d'anticorps anti- $\alpha 4\beta 7$  inhibe l'entrée des Th17 spécifiques pour MOG au niveau du gros intestin et induit le développement d'une EAE atténuée<sup>448</sup>. De même, les souris déficientes en MadCAM-1 sont moins susceptibles de développer l'EAE après immunisation avec MOG, et présentent une diminution de l'infiltrat immunitaire au niveau de la lamina propria et des PP, mais aussi dans la moelle épinière<sup>449</sup>. Enfin, il a été également montré qu'une partie des plasmocytes sécréteurs d'IgA et d'IL-10 présents dans le SNC des souris EAE sont originaires de l'intestin et participent à la suppression de la neuro-inflammation. De façon intéressante, les patients RRMS actifs présentent une diminution du pourcentage d'IgA liées aux bactéries intestinales, comparés aux RRMS en rémission, suggérant que des plasmocytes sécréteurs d'IgA pourraient sortir de l'intestin durant les poussées inflammatoires<sup>450</sup>. En outre, la surexpression de Smad7, inhibiteur du TGF $\beta$ , spécifiquement dans les LT CD4 des souris OSE, conduit à une augmentation de la démyélinisation et de l'inflammation au niveau du SNC, en favorisant notamment l'expansion de LT CD4 intestinaux inflammatoires et leur migration dans le SNC. Dans ce modèle, les LT intestinaux surexprimant Smad7 ont été trouvés en grand nombre dans les lésions des souris EAE, avec plus de 40% de LT CD4 dans les lésions de la moelle épinière originaires de l'intestin<sup>451</sup>.

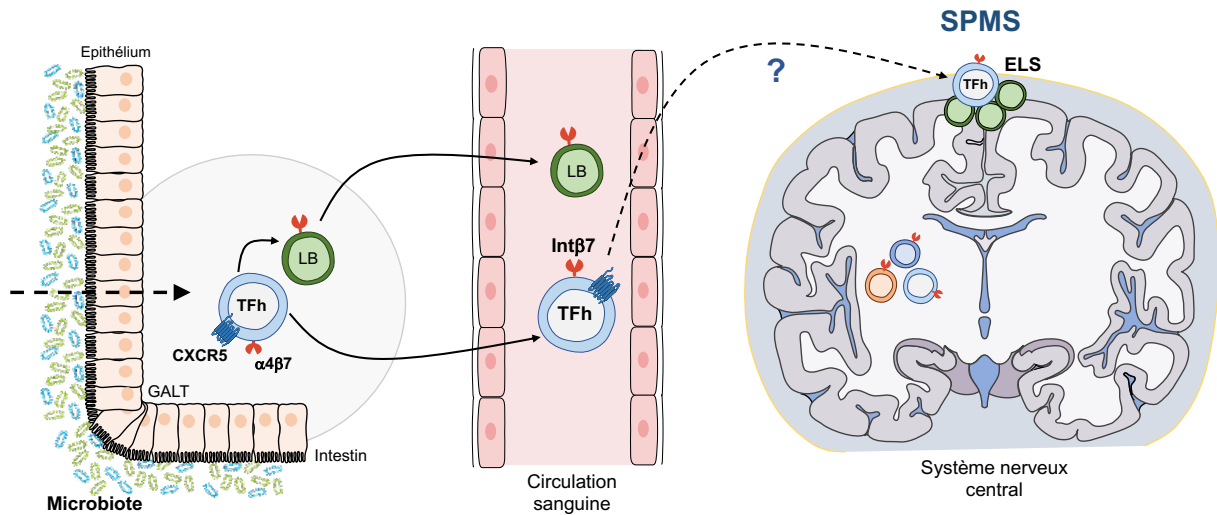
L'ensemble de ces données met en évidence l'implication du microbiote intestinal et des cellules dérivées de l'intestin dans le développement de l'EAE. De même, chez les patients SEP qui présentent une dysbiose, cela suggère que le microbiote intestinal peut être impliqué dans la physiopathologie de la maladie. Cependant, les lymphocytes dérivant de l'intestin chez l'homme et leur rôle dans la pathogenèse de la SEP sont encore peu caractérisés, mais représentent donc des cellules d'intérêt pour mieux comprendre le développement de cette maladie multifactorielle au vu des résultats obtenus dans le modèle EAE, mais également plus largement dans les différents modèles de MAI.

## Problématique et objectifs de la thèse

La SEP est une maladie multifactorielle dont l'origine est encore inconnue. L'étude de cette maladie a permis de mettre en évidence le rôle du système immunitaire ainsi que l'impact des facteurs environnementaux dans son développement. La compréhension des phases RRMS et SPMS, et notamment les mécanismes impliqués dans la transition entre les deux phases est un enjeu majeur afin de pouvoir envisager des options thérapeutiques efficaces. La modulation du microbiote intestinal dans les modèles murins impacte les propriétés des LT au niveau des GALT et du CNS. Par ailleurs, il a été également montré que les LT intestinaux sont capables de migrer dans les organes cibles des MAI. La dysbiose observée chez les patients SEP pourrait donc également modifier la pathogénicité des LT intestinaux qui pourraient participer à l'inflammation du SNC.

Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse générale que les LT CD4 dérivant de l'intestin sont impliqués dans la physiopathologie de la SEP (**Figure 24**). Au vu de la présence d'ELS dans la phase SPMS, mais aussi de l'implication des LB en RRMS, nous avons particulièrement étudié les caractéristiques des TFh dérivés de l'intestin d'abord chez les sujets sains puis chez les patients SEP. Les mécanismes impliqués dans la formation des ELS dans la SEP sont très mal connus, et pourraient être le résultat d'événements initiés dès la phase RRMS où une inflammation méningée est décrite. Une meilleure compréhension des acteurs immunitaires impliqués dans la formation des ELS pourrait donc ouvrir de nouvelles perspectives thérapeutiques en phase SPMS mais également en phase RRMS.

L'obtention d'échantillons de tissus intestinaux de patients SEP étant éthiquement impossible, nous étudions les caractéristiques des lymphocytes dérivant de l'intestin à partir de prélèvements sanguins en les identifiant par leur expression de l'intégrine  $\beta 7$ . Plusieurs études indiquent que les propriétés des LT CD4 int $\beta 7^+$  périphériques reflètent les propriétés des LT CD4 intestinaux tant dans les modèles animaux que chez l'homme. Ainsi, l'étude des LT CD4 int $\beta 7^+$  du sang, actuellement peu décrits, pourraient permettre de mettre en évidence les altérations de la réponse des LT CD4 dans l'intestin chez l'homme et leur implication dans les pathologies auto-immunes notamment la SEP.



**Figure 24: Hypothèse de l'étude sur le potentiel rôle des TFh intestinaux dans la pathogenèse de la SEP, plus particulièrement en phase SPMS.**

L'hypothèse générale de nos travaux dérive de l'implication des LT CD4 dans la SEP ainsi que de l'impact du microbiote intestinal dans le développement de l'EAE chez la souris. Les lymphocytes intestinaux dont les propriétés peuvent être altérées par le microbiote intestinal représentent une cible d'étude intéressante dans ce contexte. Plus particulièrement, nous proposons que les TFh dérivant de l'intestin, exprimant l'intégrine  $\beta 7$ , pourraient être pathogéniques dans la SEP, au niveau des GALT en induisant des LB pathogéniques et/ou, dans le SNC, en participant à la formation des ELS observés majoritairement en phase SPMS.

## Objectifs de la thèse

L'objectif de mon travail a été de mieux caractériser les LT intestinaux, particulièrement les TFh, exprimant l'intégrine  $\beta 7$  (LT CD4  $\beta 7+$  et TFh  $\beta 7+$ ) chez l'homme, i) dans un contexte physiologique afin de mieux décrire cette population, ii) dans le contexte de la SEP, pour déterminer si leurs caractéristiques sont altérées dans cette maladie. Cela a abouti à l'émergence de 2 projets :

**Projet 1** : Étude des LT CD4 exprimant l'intégrine  $\beta 7$  (LT CD4  $\beta 7+$ ) chez les patients sous Natalizumab (NTZ), traitement utilisé chez les patients RRMS afin d'inhiber la migration des LT dans le SNC.

*Ce projet fait l'objet d'un article soumis.*

**Projet 2** : Implication des TFh dérivant de l'intestin dans la physiopathologie de la SEP. Cette étude comprend plusieurs axes :

- 1) Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des TFh  $\beta 7+$  chez les sujets sains
- 2) Caractérisation phénotypique et fonctionnelle des TFh  $\beta 7+$  chez les patients SEP

*Ce projet n'a pas encore abouti à une publication dans la littérature scientifique et les travaux sont toujours en cours.*

## **Projet 1 : Le profil Th17 de type Th1 induit par le Natalizumab dans la sclérose en plaques est restreint aux LT CD4 exprimant l'intégrine $\beta$ 7**

### **Résumé**

Le Natalizumab est un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre l'intégrine  $\alpha$ 4 qui diminue efficacement la transmigration des LT CD4 inflammatoires à travers la BHE en empêchant la liaison de l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 1, exprimé par les LT, à son ligand VCAM, exprimé par les cellules endothéliales vasculaire du SNC. Ce traitement réduit efficacement le taux de rechute clinique des patients en phase RRMS. Toutefois, à l'arrêt du traitement, il a été observé une réactivation du polyomavirus John Cunningham associé à un rebond de la maladie chez 20% des patients RRMS. Les mécanismes impliqués dans cette réactivation sont peu connus mais il a été montré une augmentation de la fréquence de Th17 de type Th1 et de LT CD4 exprimant des cytokines pro-inflammatoires dans le sang des patients. Dans cette étude, nous avons voulu déterminer si les propriétés des LT intestinaux, exprimant l'intégrine  $\beta$ 7, sont altérées chez les patients sous NTZ. Nous avons pu montrer que les patients sous NTZ ont une augmentation de la proportion de Th17 de type Th1 ainsi que de LT CD4 co-exprimant l'IL-17 et le GM-CSF ainsi que l'IL-17 et l'IFN $\gamma$ , dans la circulation sanguine, spécifiquement dans le compartiment exprimant l'intégrine  $\beta$ 7.

Notre étude montre que les LT CD4 mémoires circulants exprimant l'intégrine  $\beta$ 7 sont enrichies en LT pro-inflammatoires chez les patients en phase RRMS traités au NTZ, suggérant leur implication dans les mécanismes de réactivation de la maladie après arrêt du traitement.



# The Th1-like Th17 profile induced by natalizumab in multiple sclerosis is restricted to integrin $\beta$ 7+ CD4 T cells

Mélanie Nguyen Ky<sup>1§</sup>, Adrien Duran<sup>1§</sup>, Agnès Bru<sup>1</sup>, Anaëlle Stum<sup>1</sup>, Mathilde Deloire<sup>2</sup>, Bruno Brochet<sup>2</sup>, Aurélie Ruet<sup>2</sup>, Nathalie Schmitt<sup>1\*</sup>

<sup>§</sup>MNK and AD contributed equally to this work

**Short title:** Integrin  $\beta$ 7+ Th1-like Th17 under natalizumab

## **Affiliations:**

<sup>1</sup> *Immunoconcept, CNRS UMR 5164, Bordeaux University, Bordeaux 33076, France*

<sup>2</sup> *Service de Neurologie, CRC SEP, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, Bordeaux, France.*

## **\*Correspondence to:**

Nathalie Schmitt: [nathalie.schmitt@inserm.fr](mailto:nathalie.schmitt@inserm.fr). CNRS UMR 5164, Bordeaux University, CNRS UMR 5164, Université de Bordeaux, Bât 1B, RDC, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

## Abstract

Natalizumab is a monoclonal humanized antibody directed against integrin  $\alpha 4$  which efficiently decreases the transmigration of inflammatory CD4 T cells across the blood-brain barrier and reduces clinical relapse rate in relapsing-remitting multiple sclerosis by preventing the binding of integrin  $\alpha 4\beta 1$  expressed by lymphocytes to its ligand VCAM expressed on brain vascular endothelial cells. However, natalizumab discontinuation following reactivation of the John Cunningham polyomavirus has been associated to a rebound of the disease in 20% of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. The mechanisms involved in the reactivation of multiple sclerosis following natalizumab are not known but natalizumab treatment has been shown to increase the frequencies of CD4 T cells expressing proinflammatory cytokines as well as the proportion of Th1-like Th17 cells in the blood of relapsing-remitting multiple sclerosis patients. Beside integrin  $\beta 1$ , integrin  $\alpha 4$  also associates in heterodimer with integrin  $\beta 7$  to form the gut-homing receptor integrin  $\alpha 4\beta 7$ . Studies in mouse models of autoimmune diseases including multiple sclerosis have shown that the composition of the gut microbiota alters the properties of intestinal lymphocytes and that intestinal lymphocytes including CD4 T cells can migrate to the target organs of autoimmune disease and participate to their pathogenesis. Accordingly, lymphocytes expressing gut-homing receptors are detected in large proportions in the CSF and brain of multiple sclerosis patients. In this study, we investigated whether the properties of blood integrin  $\beta 7+$  memory CD4 T cells are altered in relapsing-remitting multiple sclerosis patients receiving natalizumab. We demonstrated that natalizumab leads to an increased proportion in the circulation of proinflammatory Th1-like Th17 cells as well as of IL-17/IFN $\gamma$  and IL-17/GM-CSF co-expressing memory CD4 T cells. Importantly, these increases were found to be restricted to integrin  $\beta 7$  positive memory CD4 T cells. We further show that while integrin  $\beta 7+$  Th1 and Th2 cells migrated less efficiently than their integrin  $\beta 7-$  counterparts across a monolayer of brain microvascular endothelial cells, the migration of integrin  $\beta 7+$  Th1/17 memory CD4 T cells was similar to the one of integrin  $\beta 7-$  Th1/17. Our study therefore shows that circulating integrin  $\beta 7$  positive memory CD4 T cells of MS patients treated with natalizumab are specifically enriched in pathogenic proinflammatory cells and supports the hypothesis that integrin  $\beta 7+$  memory CD4 T cells could play a pathogenic role in the disease reactivation observed at natalizumab discontinuation in 20% of relapsing-remitting multiple sclerosis patients.

**Keywords:** multiple sclerosis, CD4 T cells, integrin  $\beta 7$ , Th1-like Th17, natalizumab

## Introduction

Multiple Sclerosis (MS) is a chronic, inflammatory and neurodegenerative disease which results from the autoimmune destruction of myelin and associated collateral tissue damage within the central nervous system (CNS)<sup>1</sup>. Studies using the experimental autoimmune encephalitis (EAE) animal models as well as studies with MS patient samples have established CD4 T cells as a central immune component in the pathogenesis<sup>2</sup>. Among CD4 T cell subsets, Th17, Th1 and more recently Th1 like Th17 cells (Th1/17) have been shown to be pathogenic in EAE and MS. These subsets, especially Th1/17 cells infiltrate the CNS of MS patients<sup>2,3</sup> and are thought to be one of the main drivers of the CNS inflammation and lesion formation particularly during the inflammatory relapsing-remitting phase (RRMS) of the disease.

Natalizumab is a monoclonal humanized antibody directed against the  $\alpha 4$  subunit of the integrin  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) which prevents the binding of integrin  $\alpha 4\beta 1$  expressed by lymphocytes to its ligand VCAM expressed on the brain vascular endothelium. Natalizumab efficiently reduces the transmigration of inflammatory immune cells across the blood-brain barrier (BBB) and reduces clinical relapse rate in RRMS. Studies have shown that natalizumab treatment reduces the expression on lymphocytes of both subunit of VLA-4 but also the expression of integrin  $\alpha L$  (CD11a), a subunit of LFA1 which binds to ICAM and together with VLA-4 mediates the transmigration of leucocytes through the BBB. Natalizumab treatment is however associated to the risk of developing progressive multifocal leukoencephalopathy (PML) due to the reactivation in the CNS of the John Cunningham polyomavirus (JCV)<sup>4</sup>, and natalizumab treatment is therefore eventually interrupted. Natalizumab discontinuation has been associated to a rebound of the disease, defined as higher relapse rate after cessation of natalizumab than before natalizumab, in 20% of RRMS patients<sup>5,6</sup>. The mechanisms involved in the reactivation of MS following natalizumab discontinuation are not known but natalizumab treatment has been shown to increase the frequencies of CD4 T cells expressing proinflammatory cytokines as well as the proportion of Th1/17 cells in the blood of RRMS patients<sup>7,8</sup>.

Beside integrin  $\beta 1$ , integrin  $\alpha 4$  also associates in heterodimer with integrin  $\beta 7$  to form the gut-homing receptor integrin  $\alpha 4\beta 7$  and accordingly natalizumab has been shown to be efficient in treating Crohn's disease patients. Integrin  $\alpha 4\beta 7$  as well as CCR9, another gut-homing receptor, are induced on the T cells following activation in gut inductive sites by CD103+ dendritic cells in a retinoic acid-dependent manner. Integrin  $\alpha 4\beta 7$  and CCR9 mediate the homing of memory and effector T cells to the gut associated lymphoid tissue (GALT) where their ligand MAdCAM-1 and CCL25 are highly expressed<sup>9,10</sup>. CD4 T cells expressing integrin  $\alpha 4\beta 7$  and/or CCR9 are detected in the cerebrospinal fluid (CSF) of MS patients and patients with non-inflammatory neurological diseases<sup>11,12</sup> while the gene encoding

integrin  $\beta 7$  is found expressed on the majority of IgA+ B cells in the brain of MS patients<sup>13</sup>. Studies in mouse models of autoimmune diseases including MS have further shown that the composition of the gut microbiota alters the properties of intestinal lymphocytes and that intestinal lymphocytes including CD4 T cells can migrate to the target organs of autoimmune disease and participate to their pathogenesis<sup>14-17</sup>.

Based on these findings, we investigated whether the properties of blood integrin  $\beta 7$ + memory CD4 T cells are altered in RRMS patients receiving natalizumab. To this end, we analyzed the phenotype and cytokine expression profile of integrin  $\beta 7$ -expressing memory CD4 T cells in healthy donors and RRMS patients treated or not with natalizumab. We found that integrin  $\beta 7$  positive memory CD4 T cells present increased proportions of Th1-like Th17 (Th1/17) as well as IL-17A/IFN $\gamma$  and IL-17A/GM-CSF co-expressing cells in natalizumab treated patients compared to non-natalizumab-treated RRMS patients and healthy donors. Importantly, this increased proinflammatory profile of circulating memory CD4 T cells was not observed in integrin  $\beta 7$  negative cells indicating that integrin  $\beta 7$  positive intestinal memory CD4 T cells might play an important role in the pathogenesis of MS relapses notably at the withdrawal of natalizumab treatment.

## **Materials and methods**

### **Patient and healthy donor samples**

Blood samples from RRMS patients in remission were obtained from the Neurology department of Bordeaux hospital. The study was approved by the institutional review board of the local committee (Comité de Protection des Personnes Sud-Ouest et Outre Mer III) and informed consent was obtained from all the participants or their legal guardian according to the declaration of Helsinki. The clinical and demographic characteristics of the patients are indicated in table 1. Clinical disease activity was assessed using the Expanded Disability Status Scale (EDSS). Blood from healthy donors (tubes or buffy coat) was obtained from the établissement français du sang. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by centrifugation on a gradient (Ficoll-Paque, Cytivia), used directly for experiments or frozen and stored in liquid nitrogen for subsequent use.

### **Phenotyping of PBMCs by flow cytometry**

Freshly isolated PBMCs from MS patients and healthy controls were incubated with the appropriate antibodies and Zombie Aqua fixable viability marker (Biolegend) for 15 min at room temperature in phosphate-buffer saline (PBS). Antibodies directed against CD4 (OKT4), int. $\beta 7$  (FIB504), int. $\beta 1$  (TS2/16),

int.α4 (9F10), CXCR5 (J252D4), CXCR3 (G025H7), CCR6 (G034E3), ICOS (C398.4A), PD-1 (EH12 2H7) were from Biolegend. CD3 (UCHT1), CXCR5 (RF8B2) and CD20 (2H7) mAbs were from BD Biosciences and anti-CD45RA (2H4) from Beckman-Coulter. In some experiments PBMCs were pre-incubated with int.β1 (P5D2) or int.β7 (FIB504) unlabeled antibodies (both from Biolegend) for 1 hour at 37 degrees prior to surface staining with fluorochrome-labelled antibodies. Cells were acquired on a BD LSRII Fortessa (BD Biosciences). Expression of each molecule was analyzed with FlowJo software (Treestar).

### **Intracellular cytokine staining**

Frozen/thawed PBMCs from MS patients and healthy donors were stimulated with phorbol 12-myristate 13-acetate (PMA, 25ng/ml) and ionomycin (1μg/ml) for 5 hours in RPMI medium supplemented with 10% FCS, L-glutamine, penicillin-streptomycin, 50μM 2-mercaptoethanol, 1mM sodium pyruvate, nonessential amino acids and 25mM HEPES in the presence of GolgiStop (BD Biosciences) and Brefeldin (eBioscience) for the last 3.5 hours before staining. After stimulation, PBMCs were surface stained with antibodies directed against CD3 (UCHT1), CD8 (SFC121Thy2D3, Beckman Coulter) and int.β7 (FIB504, BD Biosciences) and Zombie Aqua fixable viability marker. Cells were then fixed and permeabilized and incubated with IFNγ (4SB3), TNFα (Mab11), IL-22 (2G12A41), IL-17A (BL168), IL-10 (JES3-9D7), GM-CSF (BVD2-21C11) and CD45RA (HI100) mAbs from Biolegend and MIP-1β (D21-1351), IL-13 (JES10-5A2), IL-17F (O33-782) mAbs from BD Biosciences. Cells were acquired on a LSRII Fortessa and data analyzed using FlowJo software.

### **Transmigration assay**

Blood-brain barrier hCMEC/D3 cell line<sup>18</sup> was obtained from Cedarlane. This human cerebral microvascular endothelial cell line is derived from sequential limiting dilution cloning of endothelial cells from normal human brain microvascular endothelial cells transduced with lentiviral vectors carrying the SV40 T antigen and human telomerase reverse transcriptase. hCMEC/D3 were cultured at 37°C in a humidified atmosphere with 5% CO<sub>2</sub> in Endothelial Basal Medium (EBM-2, Lonza) supplemented with 5% FCS (Life technologies), ascorbic acid (5μg/ml, Sigma), 1% chemically defined lipid concentrate (Life technologies), human basic fibroblast growth factor (1ng/ml, Sigma), hydrocortisone (1.4μM, Sigma), hepes (10mM, Life technologies), penicillin and streptomycin (100U/ml each, Life technologies) in culture flasks coated with Cultrex® Rat Collagen I at 150μg/ml (R&D systems). Preliminary phenotyping of the hCMEC/D3 confirmed that they express ICAM-1 constitutively and V-CAM following stimulation with TNFα (100U/ml, Peprotech). For transmigration assay, hCMEC/D3 were seeded at 4.5x10<sup>4</sup> cells/cm<sup>2</sup> on 12 well plate transwell insert, pore size 3μm (Falcon) coated with Cultrex® Rat Collagen I (150μg/ml). hCMEC/D3 were then cultured for 7 days with

renewal of the culture medium every 2 days and, at day 6 of culture,  $\text{TNF}\alpha$  was added to hCMEC/D3 during 24 hours to induce the upregulation of the expression of adhesion molecules.

PBMCs from healthy donor buffy coats were enriched in memory CD4 T cells using memory CD4+ T cell isolation kit (Miltenyi). The cells were then labelled with antibodies directed against CD4 (RPA-T4), CD45RA (HI100), CD56 (HCD56, Biolegend), CD8 (RPA-T8, Biolegend), CXCR3 (G025H7) and CCR6 (clone G034E3). CXCR3+CCR6-, CXCR3-CCR6-, CXCR3-CCR6+ and CXCR3+CCR6+ cells were purified among CD4+CD56-CD8-CD45RA- lymphocytes by sorting with a FACSAria (BD Biosciences). Cell purity was >98%. Isolated CD4 T cell subsets were then labeled with CellTrace Violet (CTV, Life technologies) and each subset was mixed back separately with autologous unlabeled PBMCs (ratio 1:4). The PBMCs (containing CTV-labeled subsets) were then stimulated with dynabeads coated with CD3 and CD28 mAbs (Dyna). After overnight incubation, the dynabeads were removed and  $1 \times 10^6$  PBMCs resuspended in 500  $\mu\text{l}$  of RPMI supplemented with 5% FCS, L-glutamine (2mM), ascorbic acid (5  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ), 1% chemically defined lipid concentrate, human basic fibroblast growth factor (1ng/ml), hepes (10mM), penicillin and streptomycin (100U/ml each) were added to the insert containing the hCMEC/D3 previously washed. Cells were then allowed to migrate for 8 hours at 37°C and the cells and medium from top and bottom chambers were separately carefully harvested with both chambers being rinsed with PBS containing EDTA (0.1M). Cells were then labelled with mAbs specific for CD4, CD45RA, int. $\beta$ 7, int.  $\beta$ 1 and CXCR5 as well as Zombie Aqua viability dye. Countbright Absolute Counting Beads (Life technologies) were added to each fraction to determine their absolute cell numbers. The percentages of migrating cells for each int. $\beta$ 7- and int. $\beta$ 7+ Th subset were determined by calculating the number of int. $\beta$ 7- int. $\beta$ 1+ or int. $\beta$ 7+ int. $\beta$ 1low in CXCR5- cell trace violet positive (CTV+) cells contained in the top and bottom chambers and establishing the ratio between the number of these cells contained in the bottom chamber on their total number (top and bottom chambers).

### **Statistical analysis**

The significance of the difference between groups in the experiments was evaluated by Unpaired Student t test or one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant. \* $<0.5$ , \*\* $<0.1$ , \*\*\* $<0.001$ , \*\*\*\* $<0.0001$ .

## Results

### **Integrin $\alpha 4$ + memory CD4 T cells can be divided into int. $\beta 7$ +int. $\beta 1^{\text{low}}$ and int. $\beta 7$ -int. $\beta 1$ + subsets.**

Since the target of natalizumab, integrin  $\alpha 4$ , associates with int. $\beta 1$  and int. $\beta 7$  on circulating lymphocytes, we first analyzed the expression and repartition of int. $\beta 1$  and int. $\beta 7$  on int. $\alpha 4$ -expressing memory CD4 T cells in PBMCs from healthy donors and a group of RRMS patients untreated or receiving disease-modifying therapies excluding Natalizumab (RRMS NTZ-, see table 1). A representative flow cytometry profile of the expression of int. $\alpha 4$  on memory CD4 T cells is shown in figure 1A. As expected, we observed that the majority of blood memory CD4 T cells expressed integrin  $\alpha 4$  with similar percentages (Fig.1D, left) and levels (not shown) of expression in RRMS NTZ- patients and healthy donors (%:  $62.3 \pm 8.1$  versus  $60.3 \pm 10.0$  and MFI:  $2662 \pm 372$  versus  $2816 \pm 487$ , respectively, median  $\pm$  SD). We then assessed the expression of integrin  $\beta 7$  on integrin  $\alpha 4$ -expressing memory CD4 T cells (Fig.1A, right plot). Integrin  $\beta 7$  was expressed by  $30.2 \pm 6.4\%$  (median  $\pm$  SD) of integrin  $\alpha 4$ + memory CD4 T cells in healthy donors (Fig.1D) and nearly all integrin  $\beta 7$ + memory CD4 T cells expressed integrin  $\alpha 4$  (not shown). The percentage of cells expressing integrin  $\beta 7$  was lower in RRMS NTZ- patients ( $26.8 \pm 6.5\%$ , median  $\pm$  SD) compared to healthy donors (Fig.1D). However, the absolute counts of integrin  $\beta 7$ + memory CD4 T cells was not lower in healthy donors compared to RRMS NTZ- patients ( $77 \pm 35$  versus  $105 \pm 47$  cells/ $\mu\text{l}$ , median  $\pm$  SD) (Fig.1D) indicating that the decreased percentage of integrin  $\beta 7$  observed in RRMS NTZ- patients was not due to an alteration of the homeostasis of integrin  $\beta 7$ + memory CD4 T cells per se. Next, we evaluated the expression of the other subunit of integrin  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4), integrin  $\beta 1$  on integrin  $\alpha 4$ + memory CD4 T cells expressing or not integrin  $\beta 7$ . As shown in figure 1B, the intensity of integrin  $\beta 1$  expression differed between integrin  $\beta 7$ - and integrin  $\beta 7$ + memory CD4 T cell subsets with integrin  $\beta 7$ + cells expressing integrin  $\beta 1$  at low levels compared to integrin  $\beta 7$ - cells (Fig.1C). Comparison of the level of expression of integrin  $\beta 1$  in integrin  $\beta 7$ - and integrin  $\beta 7$ + subsets did not show differences in the levels of integrin  $\beta 1$  expression in the  $\beta 7$ - or  $\beta 7$ + compartment between healthy donors and RRMS NTZ- patients (Fig.1E). Integrin  $\alpha 4$ -expressing memory CD4 T cells can thus be subdivided in two subsets based on their level of expression of both integrin  $\beta 7$  and integrin  $\beta 1$ : int. $\beta 7$ - int. $\beta 1$ + and int. $\beta 7$ + int. $\beta 1^{\text{low}}$  memory CD4 T cells.

### **Integrin $\beta 7$ + memory CD4 T cells display a higher pro-inflammatory profile compared to integrin $\beta 7$ - memory CD4 T cells.**

Since CD4 T cell subsets play different pathogenic roles in MS, we next asked whether the repartition of Th1, Th2, Th17, Th1/17 and T follicular helper (TFh) cells differs between integrin  $\beta 7$ - and integrin  $\beta 7$ + memory CD4 T cells in healthy individuals and RRMS NTZ- patients. The percentages of Th subsets inside CD4 memory T cells were determined by flow cytometry using the differential expression of the

chemokine receptors CXCR3, CCR6 and CXCR5 (Fig.2A). The expression of CXCR3 and CCR6 on CXCR5-int.β7- or CXCR5-int.β7+ memory CD4 T cells defined Th1 (CXCR3+CCR6-), Th2 (CXCR3-CCR6-), Th17 (CXCR3-CCR6+) and Th1/17 (CXCR3+CCR6+) cells. Tfh cells in int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells were defined by their expression of CXCR5. Concerning Th1 and Th2 subsets, we did not observe differences in their representation between the int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cell compartment in healthy donors and RRMS NTZ- patients (Fig.2B). Th1 and Th2 percentages were also similar between healthy donors and RRMS NTZ- patients. In contrast, we observed that the proportion of Th17 and Th1/17 cells differs between int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells with int.β7+ memory CD4 T cells containing a higher percentage of Th1/17 cells and a lower percentage of Th17 cells compared to int.β7- memory CD4 T cells both in healthy donors and RRMS NTZ- patients (Fig.2B). The proportion of Th17 and Th1/17 subset did not differ between healthy donors and RRMS NTZ- patients. Concerning Tfh cells, their percentages were higher in the int.β7+ than in the int.β7- compartment both in healthy donors and RRMS NTZ- patients (Fig.2C). Furthermore, we observed that RRMS NTZ- patients presented higher percentages of Tfh cells compared to healthy donors specifically in the int.β7+ compartments.

Pro-inflammatory cytokines have been shown to play important pathogenic roles in MS and in EAE. We therefore next compared the cytokine expression profiles of int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells in healthy donors and RRMS NTZ- patients (Fig.2D). In healthy donors, int.β7+ memory CD4 T cells display a higher capacity to express the proinflammatory cytokines IFN $\gamma$ , MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-22 compared to int.β7- memory CD4 T cells. In contrast, int.β7+ memory CD4 T cells from healthy donors were less potent at expressing IL-10 and IL-13 compared to int.β7- memory CD4 T cells. As with healthy donors, a higher proportion of int.β7+ than int.β7- memory CD4 T cells expressed IFN $\gamma$  and MIP-1  $\beta$  in RRMS NTZ- patients. Surprisingly, we also noticed that lower proportion of memory CD4 T cells (both int.β7- and int.β7+) expressed IFN $\gamma$  and MIP-1  $\beta$  in RRMS NTZ- patients compared to healthy donors. No statistical differences were observed in RRMS NTZ- patients for the expression of TNF $\alpha$ , IL-22, IL-13 and IL-10 between int.β7- or int.β7+ memory CD4 T cells. GM-CSF, IL-17A, IL-17F, IL-2, IL-9, IL-2, IL-4 or IL-5 were expressed by similar proportions of int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells (Fig.S2). No difference in the expression of these cytokines was observed between healthy donors and RRMS NTZ- patients except for a slightly higher proportion of both int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells from RRMS NTZ- patients expressing IL-2 compared to healthy donors.

Altogether these results indicated that int.β7+ memory CD4 T cells display a higher inflammatory profile compared to int.β7- memory CD4 T cells in healthy donors and in RRMS NTZ- patients.



### **Natalizumab treatment decreases the expression of brain-homing molecules at the surface of int.β7+ memory CD4 T cells.**

Having defined the differences of int.β7+ and int.β7- memory CD4 T cells in RRMS NTZ- patients and healthy donors, we next examined the impact of natalizumab treatment on integrin β7+ memory CD4 T cells in RRMS patients. Since natalizumab induces the retention of lymphocytes in periphery, we first asked whether the absolute count of circulating int.β7+ memory CD4 T cells was altered in natalizumab-treated RRMS (RRMS NTZ+) patients. We observed that the absolute blood counts of total CD4 and memory CD4 T cells as well as those of int.β7- but also int.β7+ memory CD4 T cells were increased in RRMS NTZ+ patients compared to RRMS NTZ- patients and healthy donors (Fig.3A). As expected, the level of expression of integrin α4 was decreased on RRMS NTZ+ compared to RRMS NTZ- patients and healthy donors. This decrease of expression of integrin α4 was accompanied by a decrease of the MFI of Int.β7+ on memory CD4 T cells (Fig.3B). However, despite this decrease in the intensity of integrin β7 expressed by memory CD4 T cells under NTZ, integrin β7-expressing memory CD4 T cells were still identifiable in RRMS NTZ+ patients by flow cytometry and accordingly percentages of int.β7+ memory CD4 T cells did not differ between RRMS patients treated or not with NTZ (Fig.3C). This conserved bimodal expression of integrin β7 in RRMS NTZ+ patients therefore allowed us to compare the impact of natalizumab treatment on int.β7+ and int.β7- memory CD4 T cells. We first asked whether the expression of the brain homing molecules was altered in RRMS NTZ+ patients. We studied the expression of integrin α4 and integrin β1 (both forming VLA-4 which interact with VCAM) as well as the expression of integrin β2 (forming in heterodimer with integrin αL, the integrin αLβ2 also known as LFA-1 which interacts with ICAM) (Fig.4). As expected the expression of integrin α4 was strongly reduced by natalizumab treatment in both int.β7- and int.β7+ compartments. Natalizumab treatment induced the downregulation of integrin β1 on int.β7- but also on int.β7+ memory CD4 T cells. Concerning, integrin β2, although not expressed in heterodimer with integrin α4, we observed that its expression was reduced by natalizumab in int.β7 and int.β7+ compartment with a more drastic reduction on int.β7+ memory CD4 T cells compared to int.β7- CD4 T cells (p<0.001, one-way ANOVA). These data indicate that int.β7+ memory CD4 T cells from natalizumab-treated patients present a reduced expression of the molecules involved in the transmigration of lymphocytes across the blood-brain barrier in MS notably of the subunit of LFA-1, the integrin β2.

### **Integrin β7+ memory CD4 T cells from RRMS patients treated with natalizumab contain an increased proportion of Th1/17 cells**

Int.β7+ memory CD4 T cells contain a high proportion of Th1/17 compared to int.β7- memory CD4 T cells (Fig.2B) and natalizumab treatment has been shown to increase the proportion of Th1/17 cells in

RRMS patients<sup>8</sup>. We therefore next asked what was the impact of natalizumab treatment on the Th polarization of int.β7+ memory CD4 T cells. We proceeded as previously to compare the proportion of Th1, Th2, Th17, Th1/17 and Tfh in intβ7- and int.β7+ memory CD4 T cells across healthy donors, RRMS NTZ- and NTZ+ patients (Fig.5A). Concerning the Th1, Th2, Th17 and Th1/17 subsets contained in the integrin β7- compartment, we only observed a limited increase of the proportion of Th1/17 cells in RRMS NTZ+ patients ( $36.8 \pm 5.9\%$ , median  $\pm$  SD) compared to RRMS NTZ- patients ( $31.0 \pm 7.3\%$ , median  $\pm$  SD) and healthy donors ( $30.2 \pm 7.1\%$ , median  $\pm$  SD) and no modification in the proportion of Th1, Th2 and Th17 cells. The increase of Th1/17 proportion was also observed in intβ7+ compartment but was more pronounced than in the intβ7- compartment as  $50.8 \pm 10.2\%$  (median  $\pm$  SD) of int.β7+ memory CD4 T cells from RRMS NTZ+ patients were Th1/17 against  $35.5 \pm 6.9\%$  (median  $\pm$  SD) in RRMS NTZ- patients and  $40.1 \pm 9.4\%$  (median  $\pm$  SD) in healthy donors. This increase of int.β7+ Th1/17 percentages in RRMS NTZ+ patients was associated to a decrease of the proportion of both int.β7+ Th1 and Th2 cells in RRMS NTZ+ compared RRMS NTZ- and healthy donors. The proportion of Th17 cells expressing int.β7 was also higher in RRMS NTZ+ as well as in RRMS NTZ- patients compared to healthy donors but did not differ between the two groups of patients. Concerning TFh cells, the higher percentages of TFh cells observed in int.β7+ memory CD4 T Cells in RRMS NTZ- patients was conserved under NTZ while in the int.β7- compartment, the proportion of TFh cells was more elevated in RRMS NTZ+ patients (Fig.5B)

We next assessed the impact of natalizumab treatment on the expression of CD226, PD-1 and ICOS by int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells in RRMS patients. CD226 has been shown to promote the differentiation and proliferation of proinflammatory CD4 T cell subsets as well as their secretion of IFNγ and IL-17<sup>19</sup>. Genome-wide association studies (GWAS) have defined CD226 allelic variants as a risk factor for MS<sup>20</sup> and blocking CD226 in EAE reduced the disease onset<sup>21</sup>. Here, we observed that the percentage of CD226-expressing cells was specifically increased in int.β7+ memory CD4 T cells in RRMS NTZ+ patients compared to RRMS NTZ- patients and healthy donors (Fig.C). Human and mouse studies indicate that PD-1 and ICOS play a role in the pathogenesis of MS and EAE. PD-1 polymorphism has been associated with disease progression in MS<sup>22,23</sup>. Furthermore, the levels of PD-1 expression have been shown to be reduced on CD4 T cells in acute MS<sup>24,25</sup> and accordingly mice deficient for PD-1 develop more severe EAE<sup>26</sup>. While ICOS is known to promote the expansion of Th1/17 in humans<sup>27</sup>, mice deficient for ICOS present an enhance susceptibility to EAE<sup>28</sup> suggesting a different role of ICOS during the disease. Study of the level of expression of these two molecules in int.β7- and int.β7+ compartments showed that PD-1 and ICOS were expressed by a reduced fraction of int.β7+ memory CD4 T cells in RRMS NTZ+ patients compared to healthy donors and RRMS NTZ- patients while the expression of these molecules in the int.β7- cells was not altered (Fig.5B).

Altogether, these results showed that integrin  $\beta$ 7-expressing memory CD4 T cells present in the circulation of RRMS patients under natalizumab possess an increased pathogenic phenotype.

### **Natalizumab treatment induces an increased Th1/17 cytokine expression profile of integrin $\beta$ 7+ memory CD4 T**

Natalizumab treatment has been shown to increase the expression of IFN $\gamma$  and IL-17A in CD4 T cells<sup>7</sup> as well as the expression of IFN $\gamma$  and GM-CSF in Th1/17 cells<sup>8</sup> in RRMS patients. Since we observed an increase of the proportion of Th1/17 cells in int. $\beta$ 7+ memory CD4 T cells from RRMS NTZ+ patients, we next determined whether this was associated to an increased capacity of these cells to express pro-inflammatory cytokines notably those associated to the Th1/17 phenotype and MS pathogenicity. Concerning int. $\beta$ 7- memory CD4 T cells, we did not observe differences in the expression of the studied cytokines between RRMS NTZ+ and RRMS NTZ- patients or healthy donors (Fig.6A, top row). In contrast, higher proportions of int. $\beta$ 7+ memory CD4 T cells from RRMS NTZ+ patients expressed the proinflammatory cytokines GM-CSF, IL-17A, IL-17F and IL-22 when compared to RRMS NTZ- patients and healthy donors (Fig.6A, bottom row). Concerning IFN $\gamma$ , its expression by int. $\beta$ 7+ memory CD4 T cells was lower in RRMS NTZ+ patients than in healthy donors similarly to what we observed with RRMS NTZ- patients but did not differ between RRMS NTZ- and RRMS NTZ+ patients. We furthermore observed that the regulatory cytokine IL-10 was expressed by a lower proportion of int. $\beta$ 7+ memory CD4 T cells in RRMS NTZ+ patients than in RRMS NTZ- patients and healthy donors. Of note, the percentages of memory CD4 T cells expressing TNF $\alpha$ , IL-9, IL-4, IL-5, IL-13 were not altered by NTZ treatment (not shown) while the percentages of int. $\beta$ 7- and int. $\beta$ 7+ cells expressing IL-2 and int. $\beta$ 7- cells expressing IL-21 in RRMS NTZ+ patients were lower than in RRMS NTZ- patients and similar to those of healthy donors (Fig.S3).

Since Th1/17 cells are defined by their co-expression of both Th1 and Th17-related factors, we next studied whether the co-expression of Th1 and Th17-related cytokines by int. $\beta$ 7+ memory CD4 T cells was altered under natalizumab. Despite the reduced expression of IFN $\gamma$  observed in int. $\beta$ 7+ cells from RRMS patients, we found that the proportion of IFN $\gamma$ + IL-17A+ memory CD4 T cells was significantly higher in RRMS NTZ+ patients compared to healthy donors and RRMS NTZ-patients (Fig.6B). Similarly, the proportion of IL-17A+GM-CSF+ cells contained in int. $\beta$ 7+ memory CD4 T cells was more important in RRMS NTZ+ patients (Fig.6B).

These data show that natalizumab-treated patients present an augmentation in the proportion of circulating pathogenic Th1/Th17 cells largely restricted to integrin  $\beta$ 7+ memory CD4T cells.

### **Th1/17 CD4 T cells expressing integrin $\beta 7$ + display a high capacity to transmigrate through an in vitro model of blood-brain barrier.**

CD4 T cells co-expressing IFN $\gamma$  and IL-17 have been identified in the CNS of MS patients and have been shown to have an advantage to cross the BBB and access the CNS both in vitro and in vivo in EAE model<sup>3</sup>. Having found an increased proportion of Th1/17 and IFN $\gamma$ +IL-17+ memory CD4 T cells in integrin  $\beta 7$ + memory CD4 T cells in RRMS patients under natalizumab, we aimed at determining the capacity of int. $\beta 7$ + Th1/17 cells to transmigrate through the human BBB. To this end, we used an artificial in vitro model of BBB previously described consisting of a monolayer of hCMEC/D3, a human endothelial cell line derived from brain microvascular endothelial cells grown on culture insert<sup>18</sup>. Since the expression of the chemokine receptors CXCR3 et CCR6 is altered upon cell culture, we first sorted CXCR3+CCR6-, CXCR3-CCR6-, CXCR3-CCR6+ and CXCR3+CCR6+ memory CD4 T cells from healthy donor PBMCs and labelled them with CellTrace Violet (CTV). The different subsets were then mixed back separately with autologous PBMCs and the cells were stimulated overnight for optimal activation of the integrins<sup>29</sup>. The PBMCs (containing the CTV-labelled Th subsets) were then assessed for their capacity to migrate through a monolayer of hCMEC/D3 grown on transwell inserts. The percentages of migration of the different int. $\beta 7$ - or int. $\beta 7$ + Th1, Th2, Th17 and Th1/17 subsets were calculated based on the numbers of CTV+ CXCR5- expressing or not integrin  $\beta 7$  cells contained in the top and bottom chambers. We found that int. $\beta 7$ + Th1/17 cells migrated as efficiently as int. $\beta 7$ - Th1/17 and Th1 cells through the hCMEC/D3 layer. Furthermore, int. $\beta 7$ + Th1/17 cells transmigrated more efficiently than int. $\beta 7$ + Th1, Th2 and Th17 subsets but also than int. $\beta 7$ - Th2 and Th17 cells. In contrast, int. $\beta 7$ + Th1 and Th2 subsets displayed a lower capacity to transmigrate compare to their int. $\beta 7$ - counterparts ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  respectively, Mann-Whitney test) while the percentages of migrating cells did not statistically differ between Int. $\beta 7$ + and int. $\beta 7$ - Th17. These data suggest that int. $\beta 7$ + Th1/17 cells transmigrate as efficiently as int. $\beta 7$ - Th1/17 cells across the BBB and could therefore play an important pathogenic role in MS.

### **Discussion**

In this study, we demonstrated that the increased proportion of circulating proinflammatory Th1/17 cells as well as IL-17+IFN $\gamma$ + and IL-17+GM-CSF+ memory CD4 T cells observed in RRMS patients under natalizumab is almost exclusively due to an alteration of the phenotype and properties of circulating integrin  $\beta 7$  positive memory CD4 T cells.

Studies on the involvement of integrin  $\alpha 4\beta 7$  in the migration of int. $\beta 7$ + memory CD4 T cells into the CNS in EAE have produced inconsistent results probably due to differences in the models and

experimental procedure used<sup>30-33</sup>. Similarly, whether integrin  $\alpha4\beta7$  can switch its ligand specificity from MAd-CAM to VCAM in vivo under inflammatory conditions as described in vitro<sup>34</sup> remains to be determined. Nonetheless, integrin  $\beta7+$  lymphocytes are observed in large proportion in human CSF including in MS patients<sup>12,13</sup>. Here, we observed that int. $\beta7+$  memory CD4 T cells express low levels of int. $\beta1$  compared to int. $\beta7-$  memory CD4 T cells. While int. $\beta7+$  memory CD4 T cells express int. $\beta1$  at levels inferior to those expressed by memory CD4 T cells under natalizumab, further studies are required to determine whether the level of int. $\beta1$  expressed by int. $\beta7+$  memory CD4 T cells permit the transmigration of memory CD4 T cells across the BBB in presence of physiological levels on int. $\alpha4$ . We observed that, beside their low expression of integrin  $\beta1$ , integrin  $\beta7+$  memory CD4 T cells expressed integrin  $\beta2$  at levels similar to int. $\beta7-$  memory CD4 T cells. In EAE, studies in mice deficient for integrin  $\alpha4$  or treated with anti-integrin  $\alpha4$  antibody showed that integrin  $\alpha4$  is critical for the trafficking of Th1 but not of Th17 into the CNS. In contrast, the entry of Th17 cells inside the CNS in EAE mice is abolished by blockade of LFA-1 (integrin  $\alpha L\beta2$ )<sup>35,36</sup> indicating that Th17 cells can migrate into the CNS independently of integrin  $\alpha4\beta1$  expression in an LFA-1-dependant manner. However, whether integrin  $\beta7+$  CD4 T cells migrate into the CNS using integrin  $\alpha L\beta2$ /ICAM, integrin  $\alpha4\beta1$ /V-CAM interaction and/or alternate mechanisms<sup>34,37</sup> remains to be determined.

While natalizumab treatment decreases the surface expression of both integrin  $\alpha4$  and integrin  $\beta1$  on circulating immune cells<sup>38</sup>, the downregulation of the expression of integrin  $\beta2$  observed on int. $\beta7-$  memory CD4 T cells in our study as well as the described downregulation of the expression of integrin  $\alpha L$ <sup>39</sup> on CD4 T cells under natalizumab suggests that both integrin  $\alpha4\beta1$  and integrin  $\alpha L\beta2$  downregulation are involved in the reduced migration of int. $\beta7-$  CD4 T cells into the CNS under natalizumab. Our results show that natalizumab treatment induces a downregulation of the integrin  $\beta2$  expression on int. $\beta7+$  memory CD4 T cells, in a more pronounced manner than on integrin  $\beta7-$  memory CD4 T cells ( $p < 0.001$ ), suggesting that the migration of integrin  $\beta7+$  memory CD4 T cells into the CNS under natalizumab might be impaired particularly due to the downregulation of integrin  $\alpha L\beta2$ . In healthy donors, we found that the proportions of Th1/17 cells and memory CD4 T cells expressing the pro-inflammatory cytokines IFN $\gamma$ , MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-22 were higher in the integrin  $\beta7+$  compartment than in the int. $\beta7-$  compartment. In contrast, a lower proportion of int. $\beta7+$  memory CD4 T cells expressed the regulatory cytokine IL-10. This cytokine expression profile is consistent with the highly inflammatory profile of the gut environment resulting from the continuous exposure of gut-immune cells to microbiota component. While studies on blood samples from RRMS patients have found that GM-CSF, IL-17 and IL-22 were expressed by a higher proportion of circulating CD4 T cells in RRMS<sup>43-45</sup>, we were not able to observe such modifications in our study neither on int. $\beta7-$  nor on int. $\beta7+$  memory CD4 T cells. This discrepancy is most likely due to the fact that the RRMS NTZ- patients

enrolled in our study were mainly inactive and either treated with immunomodulatory / immunosuppressive drugs or at an early stage of the disease (Table 1).

Studies on human PBMCs from healthy donors and MS patients using in vitro transmigration assay have demonstrated that among CD4 T cells subsets Th1/17 have the highest ability to cross the BBB in vitro<sup>3,40</sup>. Results of our in vitro transmigration assay showed that while integrin  $\beta 7^+$  Th1 and Th2 cells migrated less efficiently than their integrin  $\beta 7^-$  counterparts across a monolayer of brain microvascular endothelial cells, integrin  $\beta 7^+$  Th1/17 memory CD4 T cells migrated as efficiently as integrin  $\beta 7^-$  Th1/17. Kebir et al.<sup>3</sup> showed that Th1/17 cells co-expressing IFN $\gamma$  and IL-17 but also ROR $\gamma$ t and T-bet are present in the CNS of MS patients while in EAE, IL-17+IFN $\gamma$ + CD4 T cells are preferentially recruited in the CNS. Single-cell suspension analysis of CSF, brain tissues and blood from MS patients furthermore confirmed that Th1/17 cells are abundant in the CNS and CSF in MS patients<sup>8</sup>. GM-CSF deficient mice have been shown to be resistant to the induction of EAE<sup>41</sup> and circulating CCR6+ myelin-reactive CD4 T cells from MS patients show an enhanced production of GM-CSF, IL-17A and IFN $\gamma$  compared to healthy controls<sup>42</sup> confirming the importance of Th1/17 cells in MS pathogenesis.

In agreement with a pathogenic role of Th1/17 cells in MS, previous studies have shown that memory CD4 T cells sequestered in periphery under natalizumab display increased proinflammatory properties such as an elevated expression of CCR6 (expressed by Th17 and Th1/17 cells) and an increased expression of IL-17, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  upon CD3 stimulation<sup>7</sup>. Longitudinal study further showed that the proportion of a subpopulation of Th1/17 cells (CXCR3+CCR6+CCR3- cells) is increased in RRMS patients following natalizumab therapy<sup>8</sup>. In the same study, an increased proportion of Th1/17 cells co-expressing IFN $\gamma$  and GM-CSF under natalizumab treatment was also observed. In the present study, we found that natalizumab treatment induced an increase of the proportion of Th1/17 cells specifically in memory CD4T cells expressing integrin  $\beta 7$  while the corresponding proportions of Th1 and Th2 cells were decreased. Integrin  $\beta 7^+$  memory CD4 T cells from natalizumab-treated RRMS patients further presented an increased expression of CD226 and a decreased expression of ICOS and PD-1 suggesting a higher pathogenic potential<sup>21,26,28</sup>. We further determined that the proinflammatory cytokines GM-CSF, IL-17A, IL-17F and IL-22 were expressed by a higher proportion of integrin  $\beta 7^+$  memory CD4 T cells in natalizumab-treated patients. Study of the cytokine expression profile of integrin  $\beta 7^+$  memory CD4 T cells also confirmed that the proportion of functional Th1/17 cells was increased under natalizumab in this compartment as shown by the increased proportion of IFN $\gamma$ + IL-17A+ and GM-CSF+ IL-17A+ int. $\beta 7^+$  memory CD4 T cells. Importantly these modifications of cytokine expression profile were not observed in the integrin  $\beta 7^-$  compartment. Integrin  $\beta 7$  positive memory CD4 T cells present in the circulation of MS patients under natalizumab therefore display pathogenic properties and could play a pathogenic role in the disease reactivation observed at natalizumab discontinuation in 20% of RRMS

patients<sup>5,6</sup>. Whether the alteration of the properties of circulating memory CD4 T cells observed in untreated RRMS patients<sup>43-45</sup> are restricted to int.β7+ memory CD4 T cells and whether integrin β7+ memory CD4 T cells play an active role in MS pathogenesis remains to be determine. However, studies in mouse models support a role of gut CD4 T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis as well as an impact of the composition of the gut microbiota on their properties. Indeed, alterations in the composition of the gut microbiota has been shown to largely modify the susceptibility of EAE mice to the disease<sup>46,47</sup>. These studies further show that the composition of the gut microbiota modifies the pathogenic properties of the lymphocytes localized in the gut but also in the CNS. In humans, the ratio of IL-17A and IFNγ production levels from circulating CCR9+ to CCR9- memory CD4 T cells were found to be increased in secondary progressive MS<sup>11</sup>. Studies in mouse models of autoimmune diseases have further shown that gut-derived lymphocytes can migrate to target organs where they participate to the disease pathogenesis<sup>14,15</sup>. In EAE, IgA-producing plasmacells localized in the CNS were found to originate from the gut and suppress neuroinflammation while in humans gut microbiota-specific IgA+ B cells were found to traffic to the CNS in active MS patients<sup>13,16</sup>. In the opticospinal encephalomyelitis (OSE) mouse model, which spontaneously develops demyelinating lesions in the spinal cord and optic nerves, Smad7 overexpression in intestinal CD4 T cells was shown to promote autoimmunity and favor the expansion and migration of intestinal CD4 T cells to the CNS with more than 40% of the CD4 T cells present in the spinal cord lesions originating from the intestine<sup>17</sup>. In humans, studies of next generation sequencing of feces demonstrated alterations in the microbial composition in MS patients<sup>48</sup> and memory CD4 T cells expressing the gut-homing receptors CCR9 are detected in the CSF of MS patients<sup>11</sup>. Furthermore, transfer of gut microbiota derived from MS patients was shown to induce a significantly higher incidence of spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice compared to the transfer of the gut microbiota from the healthy twins of these MS patients<sup>49</sup>.

In conclusion, while the pathogenicity of integrin β7+ in MS is not defined in human, studies in mouse models and humans support a pathogenic role of these cells in MS. Our study, by evidencing a specific dysregulation of the integrin β7+ compartment in RRMS patients further point out to a role of gut-CD4 T cells in MS pathogenesis notably at the cessation of natalizumab treatment.

## **Acknowledgements**

We thank the staff of the neurology department of Bordeaux hospital for providing us with patient samples and the patients for participating to this study. We thank V. Pitard and A. Zouine for cell sorting and J-C. Caron, K. Eschel, M. Gassie for their technical help. We thank P. Blanco, M. Capone and H. Ueno for discussions.

## **Funding**

This study was supported by research funding from the INSERM-CNRS ATIP Avenir program, the IdEx Junior Chair program - Initiative of Excellence of the University of Bordeaux and the ARSEP foundation. MNK was the recipient successively of a fellowship from the French Ministry for higher Education, Research and Innovation, and from the ARSEP foundation.

## **Competing interests**

Dr. Brochet reports grants, research support, personal fees or non-financial support from Genzyme, Bayer, Medday, Actelion, Roche, Biogen, Celgene, Novartis, and Merck outside the submitted work.

Dr. Ruet or her institution reports grants, research support, personal fees or non-financial support from Genzyme, Bayer, Roche, Biogen, Novartis, and Merck outside the submitted work.



## References

1. Lassmann H. Multiple Sclerosis Pathology. *Cold Spring Harbor perspectives in medicine*. Mar 1 2018;8(3)doi:10.1101/cshperspect.a028936
2. Legroux L, Arbour N. Multiple Sclerosis and T Lymphocytes: An Entangled Story. *J Neuroimmune Pharmacol*. Dec 2015;10(4):528-46. doi:10.1007/s11481-015-9614-0
3. Kebir H, Ifergan I, Alvarez JI, et al. Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. Sep 2009;66(3):390-402. doi:10.1002/ana.21748
4. Clifford DB, De Luca A, Simpson DM, Arendt G, Giovannoni G, Nath A. Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet neurology*. Apr 2010;9(4):438-46. doi:10.1016/s1474-4422(10)70028-4
5. Lo Re M, Capobianco M, Ragonese P, et al. Natalizumab Discontinuation and Treatment Strategies in Patients with Multiple Sclerosis (MS): A Retrospective Study from Two Italian MS Centers. *Neurology and therapy*. Dec 2015;4(2):147-57. doi:10.1007/s40120-015-0038-9
6. Sorensen PS, Koch-Henriksen N, Petersen T, Ravnborg M, Oturai A, Sellebjerg F. Recurrence or rebound of clinical relapses after discontinuation of natalizumab therapy in highly active MS patients. *Journal of neurology*. Jun 2014;261(6):1170-7. doi:10.1007/s00415-014-7325-8
7. Kivisäkk P, Healy BC, Viglietta V, et al. Natalizumab treatment is associated with peripheral sequestration of proinflammatory T cells. *Neurology*. Jun 2 2009;72(22):1922-30. doi:10.1212/WNL.0b013e3181a8266f
8. van Langelaar J, van der Vuurst de Vries RM, Janssen M, et al. T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain : a journal of neurology*. May 1 2018;141(5):1334-1349. doi:10.1093/brain/awy069
9. Habtezion A, Nguyen LP, Hadeiba H, Butcher EC. Leukocyte Trafficking to the Small Intestine and Colon. *Gastroenterology*. Feb 2016;150(2):340-54. doi:10.1053/j.gastro.2015.10.046
10. Hamann A, Andrew DP, Jablonski-Westrich D, Holzmann B, Butcher EC. Role of alpha 4-integrins in lymphocyte homing to mucosal tissues in vivo. *Journal of immunology*. Apr 01 1994;152(7):3282-93.
11. Kadowaki A, Saga R, Lin Y, Sato W, Yamamura T. Gut microbiota-dependent CCR9+CD4+ T cells are altered in secondary progressive multiple sclerosis. *Brain : a journal of neurology*. Apr 1 2019;142(4):916-931. doi:10.1093/brain/awz012
12. Kivisäkk P, Tucky B, Wei T, Campbell JJ, Ransohoff RM. Human cerebrospinal fluid contains CD4+ memory T cells expressing gut- or skin-specific trafficking determinants: relevance for immunotherapy. *BMC Immunol*. Jul 7 2006;7:14. doi:10.1186/1471-2172-7-14

13. Pröbstel AK, Zhou X, Baumann R, et al. Gut microbiota-specific IgA(+) B cells traffic to the CNS in active multiple sclerosis. *Science immunology*. Nov 20 2020;5(53)doi:10.1126/sciimmunol.abc7191
14. Krebs CF, Paust HJ, Krohn S, et al. Autoimmune Renal Disease Is Exacerbated by S1P-Receptor-1-Dependent Intestinal Th17 Cell Migration to the Kidney. *Immunity*. Nov 15 2016;45(5):1078-1092. doi:10.1016/j.immuni.2016.10.020
15. Teng F, Klinger CN, Felix KM, et al. Gut Microbiota Drive Autoimmune Arthritis by Promoting Differentiation and Migration of Peyer's Patch T Follicular Helper Cells. *Immunity*. Apr 19 2016;44(4):875-88. doi:10.1016/j.immuni.2016.03.013
16. Rojas OL, Pröbstel AK, Porfilio EA, et al. Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell*. Apr 4 2019;177(2):492-493. doi:10.1016/j.cell.2019.03.037
17. Hauptelshofer S, Leichsenring T, Berg S, et al. Smad7 in intestinal CD4(+) T cells determines autoimmunity in a spontaneous model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Dec 17 2019;116(51):25860-25869. doi:10.1073/pnas.1905955116
18. Weksler BB, Subileau EA, Perrière N, et al. Blood-brain barrier-specific properties of a human adult brain endothelial cell line. *Faseb j*. Nov 2005;19(13):1872-4. doi:10.1096/fj.04-3458fje
19. Lozano E, Joller N, Cao Y, Kuchroo VK, Hafler DA. The CD226/CD155 interaction regulates the proinflammatory (Th1/Th17)/anti-inflammatory (Th2) balance in humans. *Journal of immunology*. Oct 1 2013;191(7):3673-80. doi:10.4049/jimmunol.1300945
20. Hafler JP, Maier LM, Cooper JD, et al. CD226 Gly307Ser association with multiple autoimmune diseases. *Genes and immunity*. Jan 2009;10(1):5-10. doi:10.1038/gene.2008.82
21. Dardalhon V, Schubart AS, Reddy J, et al. CD226 is specifically expressed on the surface of Th1 cells and regulates their expansion and effector functions. *Journal of immunology*. Aug 1 2005;175(3):1558-65.
22. Kroner A, Mehling M, Hemmer B, et al. A PD-1 polymorphism is associated with disease progression in multiple sclerosis. *Annals of neurology*. Jul 2005;58(1):50-7. doi:10.1002/ana.20514
23. Pawlak-Adamska E, Nowak O, Karabon L, et al. PD-1 gene polymorphic variation is linked with first symptom of disease and severity of relapsing-remitting form of MS. *Journal of neuroimmunology*. Apr 15 2017;305:115-127. doi:10.1016/j.jneuroim.2017.02.006
24. Mohammadzadeh A, Rad IA, Ahmadi-Salmasi B. CTLA-4, PD-1 and TIM-3 expression predominantly downregulated in MS patients. *Journal of neuroimmunology*. Oct 15 2018;323:105-108. doi:10.1016/j.jneuroim.2018.08.004

25. Trabattoni D, Saresella M, Pacei M, et al. Costimulatory pathways in multiple sclerosis: distinctive expression of PD-1 and PD-L1 in patients with different patterns of disease. *Journal of immunology*. Oct 15 2009;183(8):4984-93. doi:10.4049/jimmunol.0901038
26. Carter LL, Leach MW, Azoitei ML, et al. PD-1/PD-L1, but not PD-1/PD-L2, interactions regulate the severity of experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of neuroimmunology*. Jan 2007;182(1-2):124-34. doi:10.1016/j.jneuroim.2006.10.006
27. Paulos CM, Carpenito C, Plesa G, et al. The inducible costimulator (ICOS) is critical for the development of human T(H)17 cells. *Science translational medicine*. Oct 27 2010;2(55):55ra78. doi:10.1126/scitranslmed.3000448
28. Dong C, Juedes AE, Temann UA, et al. ICOS co-stimulatory receptor is essential for T-cell activation and function. *Nature*. Jan 4 2001;409(6816):97-101. doi:10.1038/35051100
29. Burbach BJ, Medeiros RB, Mueller KL, Shimizu Y. T-cell receptor signaling to integrins. *Immunological reviews*. Aug 2007;218:65-81. doi:10.1111/j.1600-065X.2007.00527.x
30. Döring A, Pfeiffer F, Meier M, et al. TET inducible expression of the  $\alpha 4\beta 7$ -integrin ligand MAdCAM-1 on the blood-brain barrier does not influence the immunopathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis. *European journal of immunology*. Mar 2011;41(3):813-21. doi:10.1002/eji.201040912
31. Engelhardt B, Laschinger M, Schulz M, Samulowitz U, Vestweber D, Hoch G. The development of experimental autoimmune encephalomyelitis in the mouse requires alpha4-integrin but not alpha4beta7-integrin. *The Journal of clinical investigation*. Dec 15 1998;102(12):2096-105. doi:10.1172/jci4271
32. Haanstra KG, Hofman SO, Lopes Estêvão DM, et al. Antagonizing the  $\alpha 4\beta 1$  integrin, but not  $\alpha 4\beta 7$ , inhibits leukocytic infiltration of the central nervous system in rhesus monkey experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of immunology*. Mar 1 2013;190(5):1961-73. doi:10.4049/jimmunol.1202490
33. Kanwar JR, Harrison JE, Wang D, et al. Beta7 integrins contribute to demyelinating disease of the central nervous system. *Journal of neuroimmunology*. Mar 1 2000;103(2):146-52. doi:10.1016/s0165-5728(99)00245-3
34. Wang S, Wu C, Zhang Y, et al. Integrin  $\alpha 4\beta 7$  switches its ligand specificity via distinct conformer-specific activation. *The Journal of cell biology*. Aug 6 2018;217(8):2799-2812. doi:10.1083/jcb.201710022
35. Rothhammer V, Heink S, Petermann F, et al. Th17 lymphocytes traffic to the central nervous system independently of  $\alpha 4$  integrin expression during EAE. *The Journal of experimental medicine*. Nov 21 2011;208(12):2465-76. doi:10.1084/jem.20110434

36. Glatigny S, Duhon R, Oukka M, Bettelli E. Cutting edge: loss of  $\alpha 4$  integrin expression differentially affects the homing of Th1 and Th17 cells. *Journal of immunology*. Dec 15 2011;187(12):6176-9. doi:10.4049/jimmunol.1102515
37. Schneider-Hohendorf T, Rossaint J, Mohan H, et al. VLA-4 blockade promotes differential routes into human CNS involving PSGL-1 rolling of T cells and MCAM-adhesion of TH17 cells. *The Journal of experimental medicine*. Aug 25 2014;211(9):1833-46. doi:10.1084/jem.20140540
38. Harrer A, Wipfler P, Einhaeupl M, et al. Natalizumab therapy decreases surface expression of both VLA-heterodimer subunits on peripheral blood mononuclear cells. *Journal of neuroimmunology*. May 2011;234(1-2):148-54. doi:10.1016/j.jneuroim.2011.03.001
39. Jilek S, Mathias A, Canales M, et al. Natalizumab treatment alters the expression of T-cell trafficking marker LFA-1  $\alpha$ -chain (CD11a) in MS patients. *Multiple sclerosis*. Jun 2014;20(7):837-42. doi:10.1177/1352458513513208
40. Nishihara H, Soldati S, Mossu A, et al. Human CD4(+) T cell subsets differ in their abilities to cross endothelial and epithelial brain barriers in vitro. *Fluids and barriers of the CNS*. Feb 3 2020;17(1):3. doi:10.1186/s12987-019-0165-2
41. El-Behi M, Ciric B, Dai H, et al. The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature immunology*. Jun 2011;12(6):568-75. doi:10.1038/ni.2031
42. Cao Y, Goods BA, Raddassi K, et al. Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Science translational medicine*. May 13 2015;7(287):287ra74. doi:10.1126/scitranslmed.aaa8038
43. Tao Y, Zhang X, Chopra M, et al. The role of endogenous IFN-beta in the regulation of Th17 responses in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis. *Journal of immunology*. Jun 15 2014;192(12):5610-7. doi:10.4049/jimmunol.1302580
44. Rolla S, Bardina V, De Mercanti S, et al. Th22 cells are expanded in multiple sclerosis and are resistant to IFN-beta. *Journal of leukocyte biology*. Dec 2014;96(6):1155-64. doi:10.1189/jlb.5A0813-463RR
45. Rasouli J, Ciric B, Imitola J, et al. Expression of GM-CSF in T Cells Is Increased in Multiple Sclerosis and Suppressed by IFN-beta Therapy. *Journal of immunology*. Jun 01 2015;194(11):5085-93. doi:10.4049/jimmunol.1403243
46. Berer K, Mues M, Koutrolos M, et al. Commensal microbiota and myelin autoantigen cooperate to trigger autoimmune demyelination. *Nature*. Nov 24 2011;479(7374):538-41. doi:10.1038/nature10554
47. Lee YK, Menezes JS, Umesaki Y, Mazmanian SK. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National*

*Academy of Sciences of the United States of America*. Mar 15 2011;108 Suppl 1:4615-22.  
doi:10.1073/pnas.1000082107

48. Takewaki D, Suda W, Sato W, et al. Alterations of the gut ecological and functional microenvironment in different stages of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Sep 8 2020;117(36):22402-22412.  
doi:10.1073/pnas.2011703117
49. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. Oct 3 2017;114(40):10719-10724.  
doi:10.1073/pnas.1711233114

## Figure legends

**Figure 1: Integrin  $\alpha 4^+$  memory CD4 T cells can be divided into  $\text{int.}\beta 7^+\text{int.}\beta 1^{\text{low}}$  and  $\text{int.}\beta 7\text{-int.}\beta 1^+$  subsets.**

**(A)** Representative flow cytometry plots showing the expression of integrin  $\alpha 4$  in memory CD4 T cells and the expression of integrin  $\beta 7$  in integrin  $\alpha 4^+$  memory CD4 T cells (gray filled histogram). The black thick line histogram represents the integrin  $\beta 7$  expression on cells pre-incubated with an anti-integrin  $\beta 7$  antibody. **(B)** Representative flow cytometry plots showing the expression of integrin  $\beta 1$  and integrin  $\beta 7$  on integrin  $\alpha 4^+$  memory CD4 T cells. **(C)** Overlay showing the expression of integrin  $\beta 1$  in total integrin  $\alpha 4^+$ , integrin  $\alpha 4^+$  integrin  $\beta 7^-$  and integrin  $\alpha 4^+$   $\text{int}\beta 7^+$  memory CD4 T cells preincubated (black thick line) or not (gray filled) with an anti-integrin  $\beta 1$  blocking antibody. The gray thin line histograms represent the FMO for integrin  $\beta 1$  staining. **(D)** Percentages of integrin  $\alpha 4^+$  cells in memory CD4 T cells, integrin  $\beta 7^+$  cells in integrin  $\alpha 4^+$  memory CD4 T cells in healthy individuals (n=61) and RRMS NTZ- (n=21) patients and absolute count per  $\mu\text{l}$  of blood of integrin  $\beta 7^+$  memory CD4 T cells in healthy donors (n=56) and RRMS NTZ- patients (n=20). **(E)** MFI of integrin  $\beta 1$  on integrin  $\beta 7^-$  and integrin  $7^+$  integrin  $\alpha 4^+$  memory CD4 T cells in healthy individuals (n=61) and RRMS NTZ- patients (n=20). Unpaired Student *t* test and one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

**Figure 2: Integrin  $\beta 7^+$  memory CD4 T cells display a higher pro-inflammatory profile compared to integrin  $\beta 7^-$  memory CD4 T cells.**

**(A)** Representative flow data of CXCR5 and integrin  $\beta 7$  expression on memory CD4 T cells and of CXCR3 and CCR6 expression by CXCR5-  $\text{int.}\beta 7^-$  and CXCR5-  $\text{int.}\beta 7^+$  memory CD4 T cells. **(B)** Percentages of Th1

(CXCR3+CCR6-), Th2 (CXCR3-CCR6-), Th17 (CXCR3-CCR6+) and Th1/17(CXCR3+CCR6+) cells in int.β7- and int.β7+ CXCR5- memory CD4 T cells for healthy donors (n=61) and RRMS NTZ- patients (n=21). **(C)** Percentages of TFh cells (CXCR5+) inside int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells for healthy donors (n=62) and RRMS NTZ- patients (n=33). **(D)** Percentages of int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells expressing IFN $\gamma$ , MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$ , IL-22, IL-13 and IL-10 in healthy donors (n=28-36) and RRMS NTZ- patients (n=10-14) after PMA/Ionomycin stimulation. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

**Figure 3. Natalizumab treatment induces the retention of integrin β7+ memory CD4 T cells in periphery.**

**(A)** Absolute numbers (per  $\mu$ l of blood) of CD4 T cells, memory CD4 T cells, int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells in healthy individuals (n=57) and RRMS patients not treated (NTZ-, n=32) or treated (NTZ+, n=34) with natalizumab. **(B)** Median of fluorescence intensity of integrin  $\alpha$ 4 in memory CD4 T cells and of integrin β7 on int.β7+ memory CD4 T cells in healthy donors (n=61), RRMS NTZ- (n=19-24) and RRMS NTZ+ (n=29-32) patients. **(C)** Overlay of the expression of int.β7 in memory CD4 T cells of a healthy donor (gray line), a RRMS NTZ- (blue line) and a RRMS NTZ+ (orange line) patient (left). Percentages of int.β7+ cells in memory CD4 T cells in healthy donors (n=61), RRMS NTZ- (n=24) and RRMS NTZ+ (n=32) patients (right). One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

**Figure 4: Natalizumab treatment decreases the expression of brain-homing molecules at the surface of integrin β7+ memory CD4 T cells.**

**(A)** Overlays of integrin  $\alpha$ 4, integrin β1 and integrin β2 expression on memory CD4 T cells of a healthy individual (gray line), a RRMS NTZ- (blue line) and a RRMS NTZ+ (orange line) patient. Light gray filled histograms represent cells unstained for the marker of interest (FMO). **(B)** Median of fluorescence intensity of integrin  $\alpha$ 4, integrin β1 and integrin β2 expressed by Int.β7- (top row) and Int.β7+ (bottom row) memory CD4 T cells in healthy donors (n=61), RRMS NTZ- (n=19) and RRMS NTZ+ (n=29) patients. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

**Figure 5: Integrin β7+ memory CD4 T cells from RRMS patients treated with natalizumab contain an increased proportion of Th1/17.**

**(A)** Percentages of Th1, Th2, Th17, Th1/17 in int.β7- (top row) or int.β7+ (bottom row) CXCR5- memory CD4 T cells in healthy donors (n=61), RRMS NTZ- (n=21) and RRMS NTZ+ (n=29) patients. **(B)** Percentages of TFh cells in int.β7- (top row) or int.β7+ (bottom row) memory CD4 T cells in healthy donors (n=62), RRMS NTZ- (n=33) and RRMS NTZ+ (n=38) patients **(C)** Percentages of CD226, PD-1 and

ICOS expressing cells in int. $\beta$ 7<sup>-</sup> (top row) and int. $\beta$ 7<sup>+</sup> (bottom row) memory CD4 T cells of healthy donors (n=61-62), RRMS NTZ<sup>-</sup> (n=24-33) and RRMS NTZ<sup>+</sup> (n=32-38) patients. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

**Figure 6: Integrin  $\beta$ 7<sup>+</sup> memory CD4 T cells from RRMS patients under natalizumab display an increased capacity to express GM-CSF, IL-17A and IL-22.**

**(A)** Percentages of int. $\beta$ 7<sup>-</sup> (top row) and int. $\beta$ 7<sup>+</sup> (bottom row) memory CD4 T cells expressing GM-CSF, IL-17A, IL-17F, IL-22, IFN $\gamma$  or IL-10 after PMA/Ionomycin stimulation in healthy volunteers (n=32-36), RRMS NTZ<sup>-</sup> (n=10-14) and RRMS NTZ<sup>+</sup> (n=32-37) patients. **(B)** Representative flow cytometry plot of the expression of IFN $\gamma$  and IL-17A and of GM-CSF and IL-17A by Int. $\beta$ 7<sup>+</sup> memory CD4 T cells in a healthy donor, a RRMS NTZ<sup>-</sup> and a RRMS NTZ<sup>+</sup> patient (left) and percentages of IFN $\gamma$ +IL-17A<sup>+</sup> and of GM-CSF+IL-17A<sup>+</sup> cells in int. $\beta$ 7<sup>+</sup> memory CD4 T cells in healthy donors (n=32), RRMS NTZ<sup>-</sup> (n=10) and RRMS NTZ<sup>+</sup> (n=32) patients (right). One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

**Figure 7: Th1/17 CD4 T cells expressing Integrin  $\beta$ 7<sup>+</sup> display a high capacity to transmigrate through an in vitro model of BBB.**

Percentages of migration of the indicated Th subsets expressing or not int. $\beta$ 7 across a monolayer of hCMEC/D3 stimulated for 24 hours with TNF $\alpha$ . Data from 4 experiments each performed in triplicate with a different healthy donor are shown in scattered dot plot. Floating bar (min and max) with line at median are indicated. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

# Figures

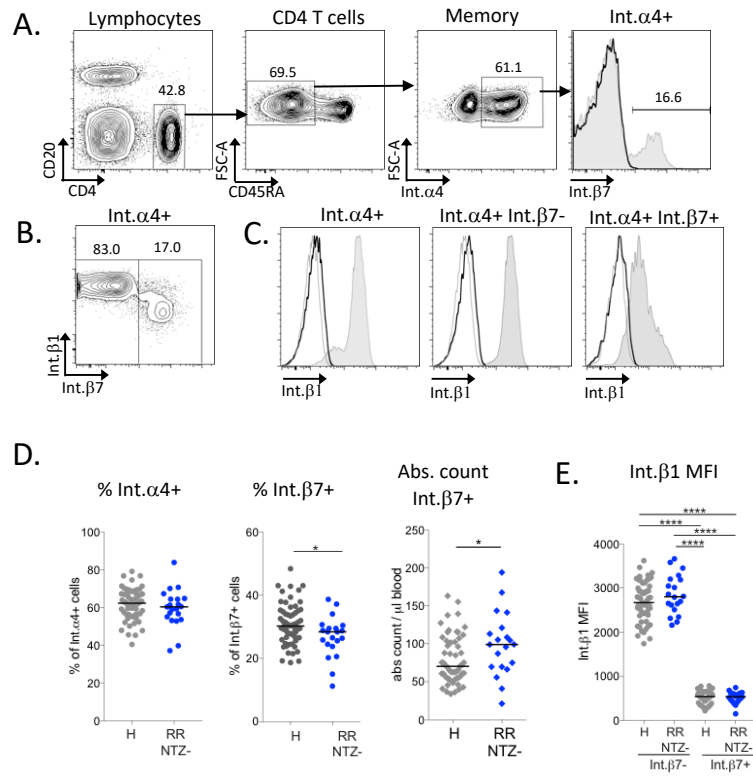
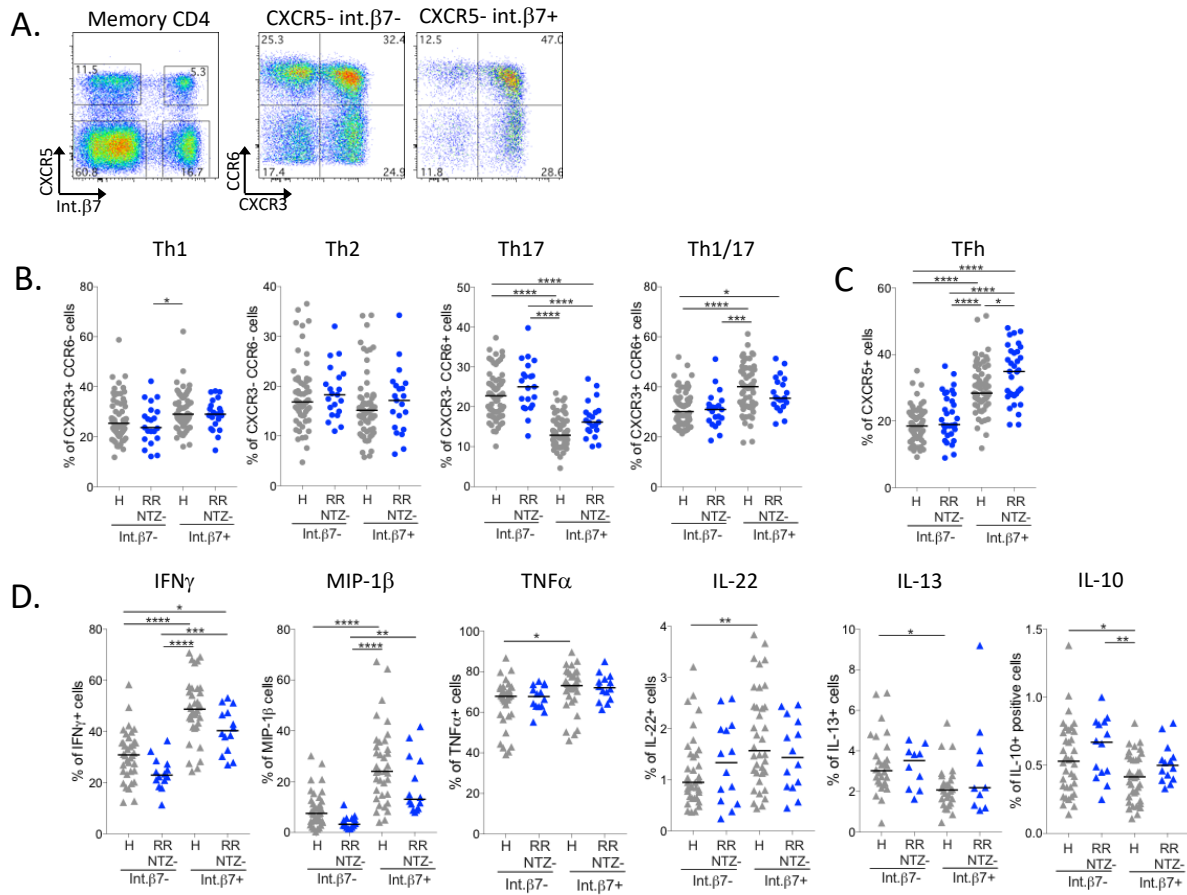
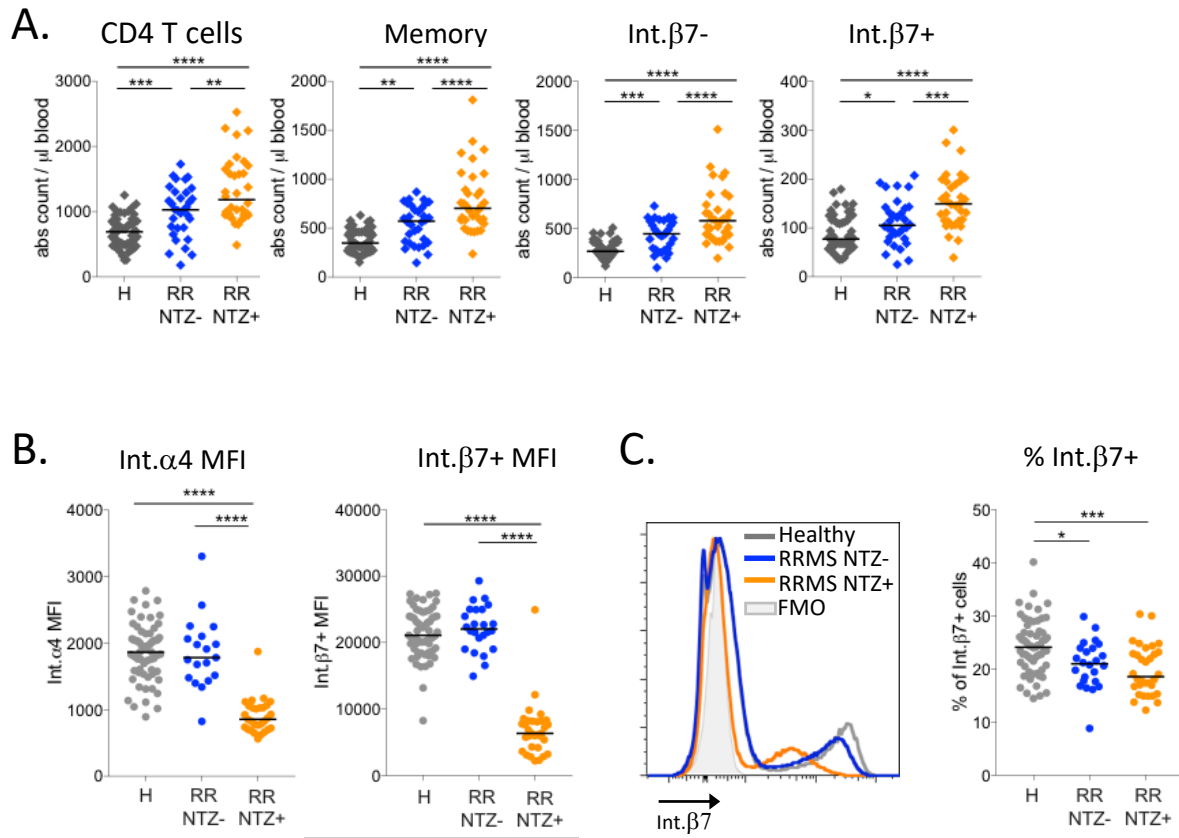


Figure 1: Integrin  $\alpha 4+$  memory CD4 T cells can be divided into  $\text{int.}\beta 7+\text{int.}\beta 1^{\text{low}}$  and  $\text{int.}\beta 7-\text{int.}\beta 1+$  subsets.

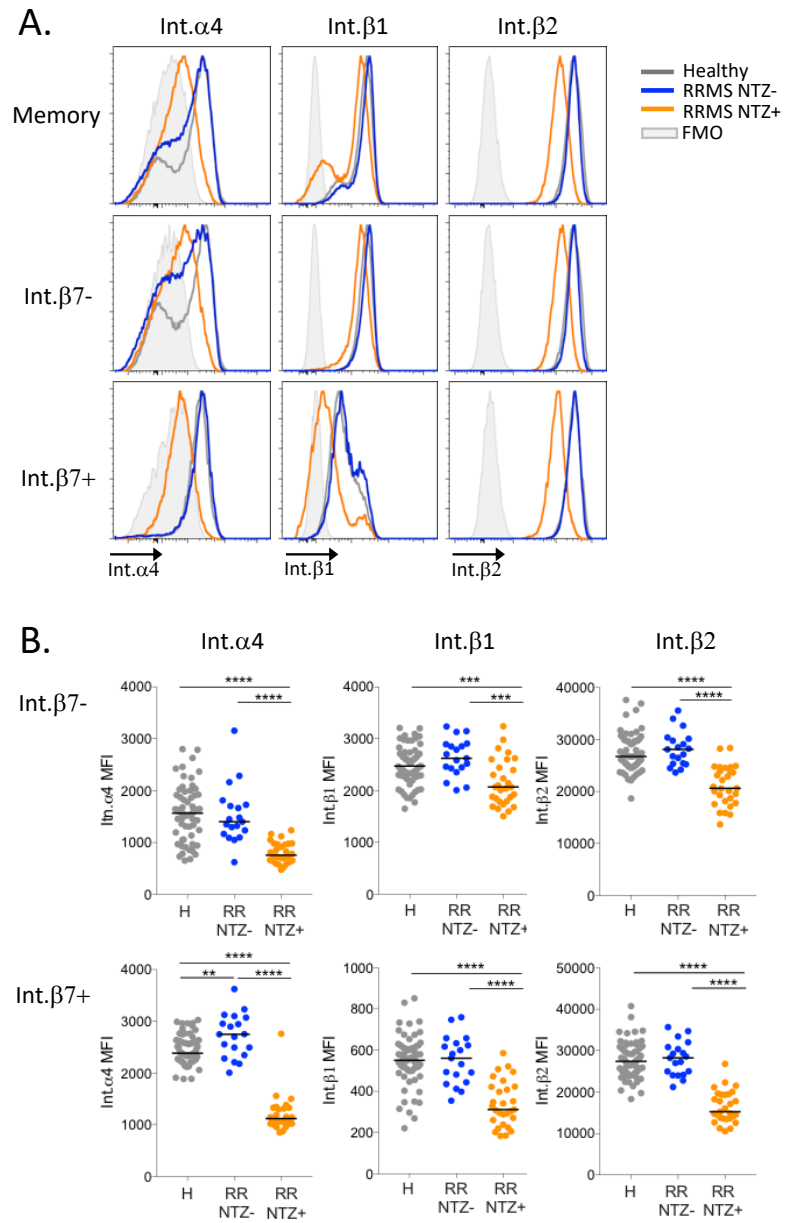




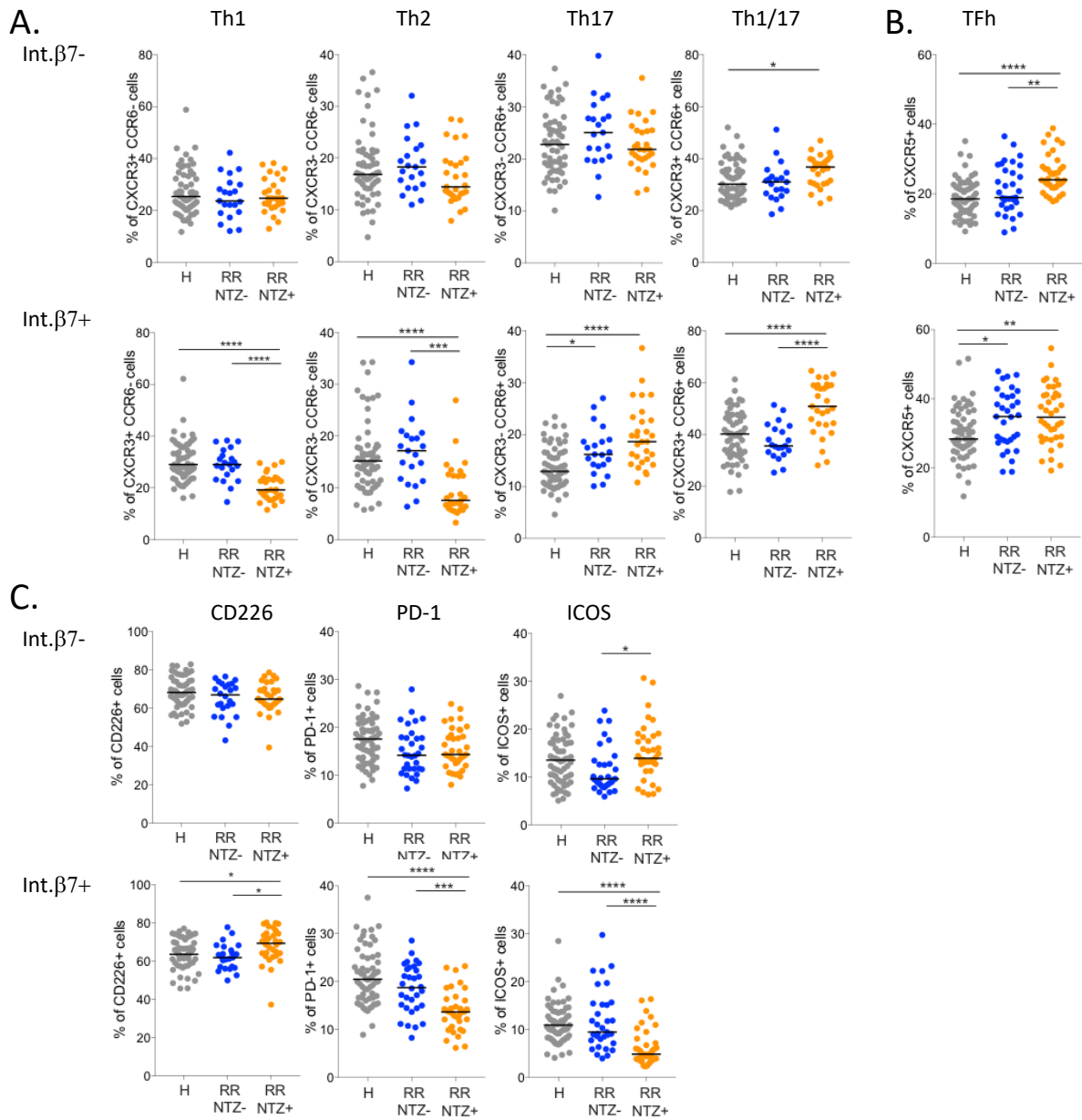
**Figure 2: Integrin  $\beta 7^+$  memory CD4 T cells display a higher pro-inflammatory profile compared to integrin  $\beta 7^-$  memory CD4 T cells.**



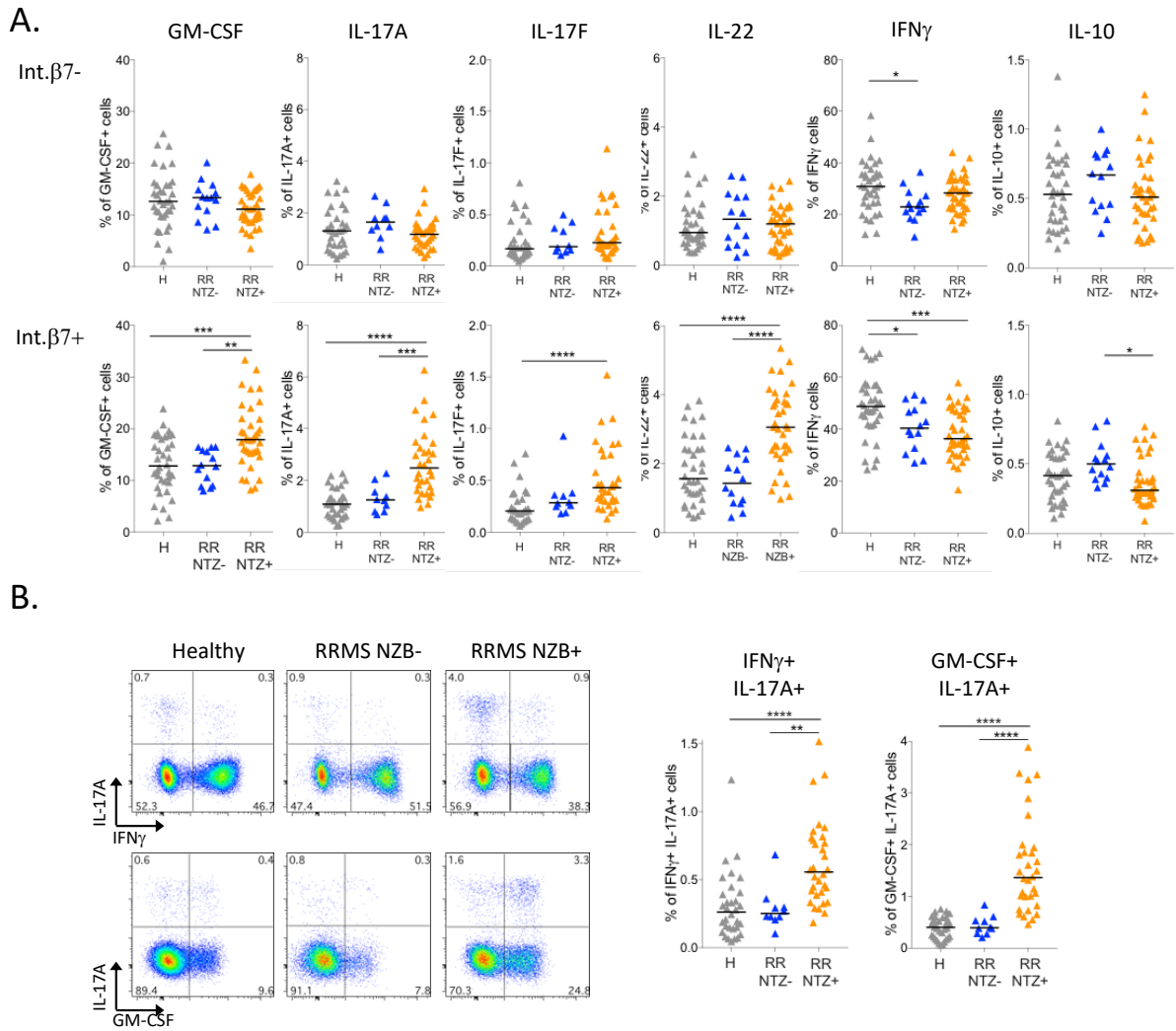
**Figure 3. Natalizumab treatment induces the retention of integrin  $\beta$ 7+ memory CD4 T cells in periphery.**



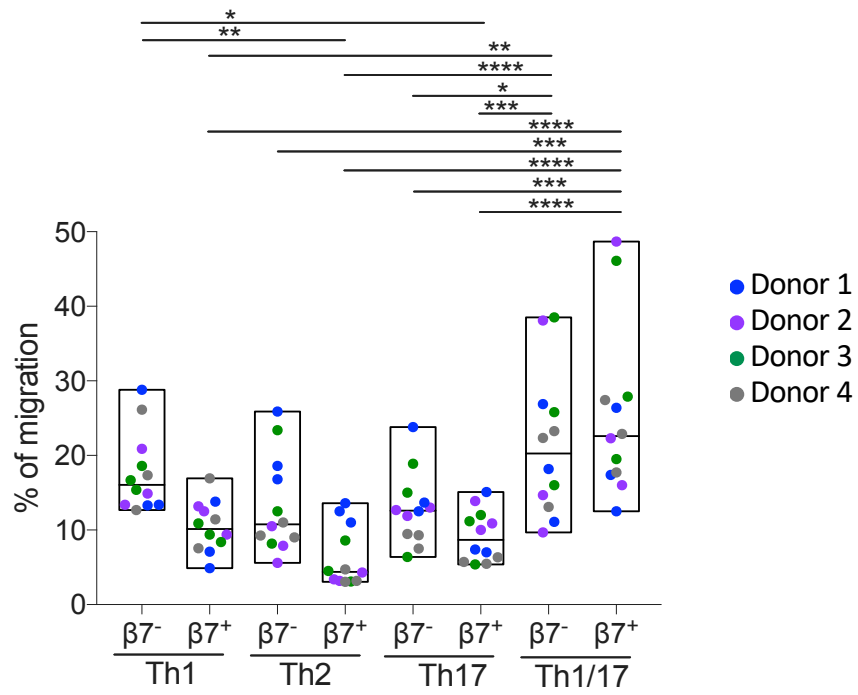
**Figure 4: Natalizumab treatment decreases the expression of brain-homing molecules at the surface of integrin  $\beta7+$  memory CD4 T cells.**



**Figure 5: Integrin β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells from RRMS patients treated with natalizumab contain an increased proportion of Th1/17.**



**Figure 6: Integrin  $\beta 7$ + memory CD4 T cells from RRMS patients under natalizumab display an increased capacity to express GM-CSF, IL-17A and IL-22.**

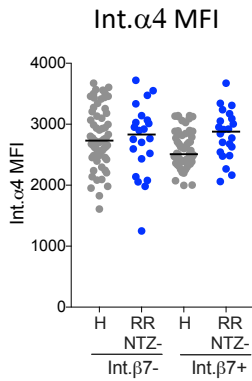


**Figure 7: Th1/17 CD4 T cells expressing Integrin  $\beta 7^+$  display a high capacity to transmigrate through an in vitro model of BBB.**

	Healthy donors	RRMS NTZ-	RRMS NTZ+
<b>N° of donors</b>	94	39	59
<b>M/F</b>	53/41	9/30	19/40
<b>Age-years</b> (median ± SD)	42 (±12)	37 (±13)	35 (±10)
<b>Disease duration</b> (months: median ± SD)		49 (±133)	110 (±93)
<b>EDSS</b> (median and range)		1.5 (0-6)	2 (0-5.5)
<b>Age at onset</b> (median ± SD)		27 (±10)	26 (±8)
<b>Total number of relapses</b> (median ± SD)		2 (±4.5)	5 (±5.0)
<b>Number of relapses per year</b> (median ± SD)		0.5 (±1.1)	0.9 (±2.4)
<b>Treatments</b>		13 untreated 13 interferon beta-1 7 glatiramer acetate 6 teriflunomide	59 natalizumab

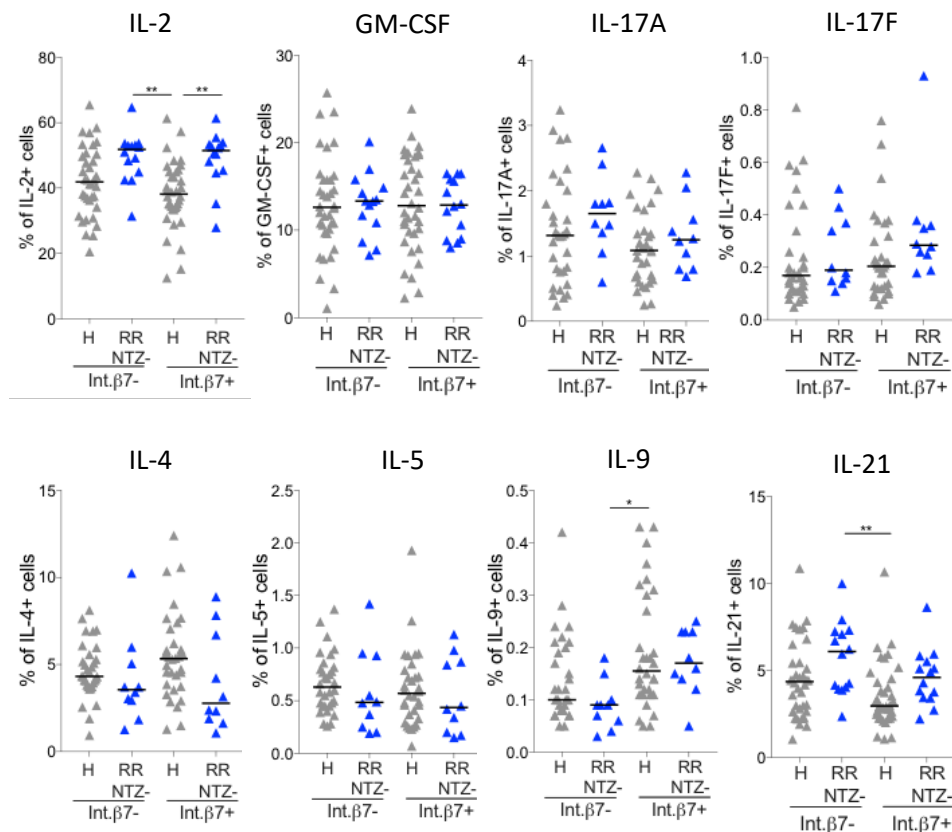
**Table 1: Clinical and demographic characteristics of the healthy donors and RRMS patients.**

## Supplemental figures



**Supplementary Figure 1: Integrin  $\beta$ <sup>7</sup>- and integrin  $\beta$ <sup>7</sup>+ integrin  $\alpha$ <sup>4</sup>+ memory CD4 T cells express integrin  $\alpha$ <sup>4</sup> at similar intensity.**

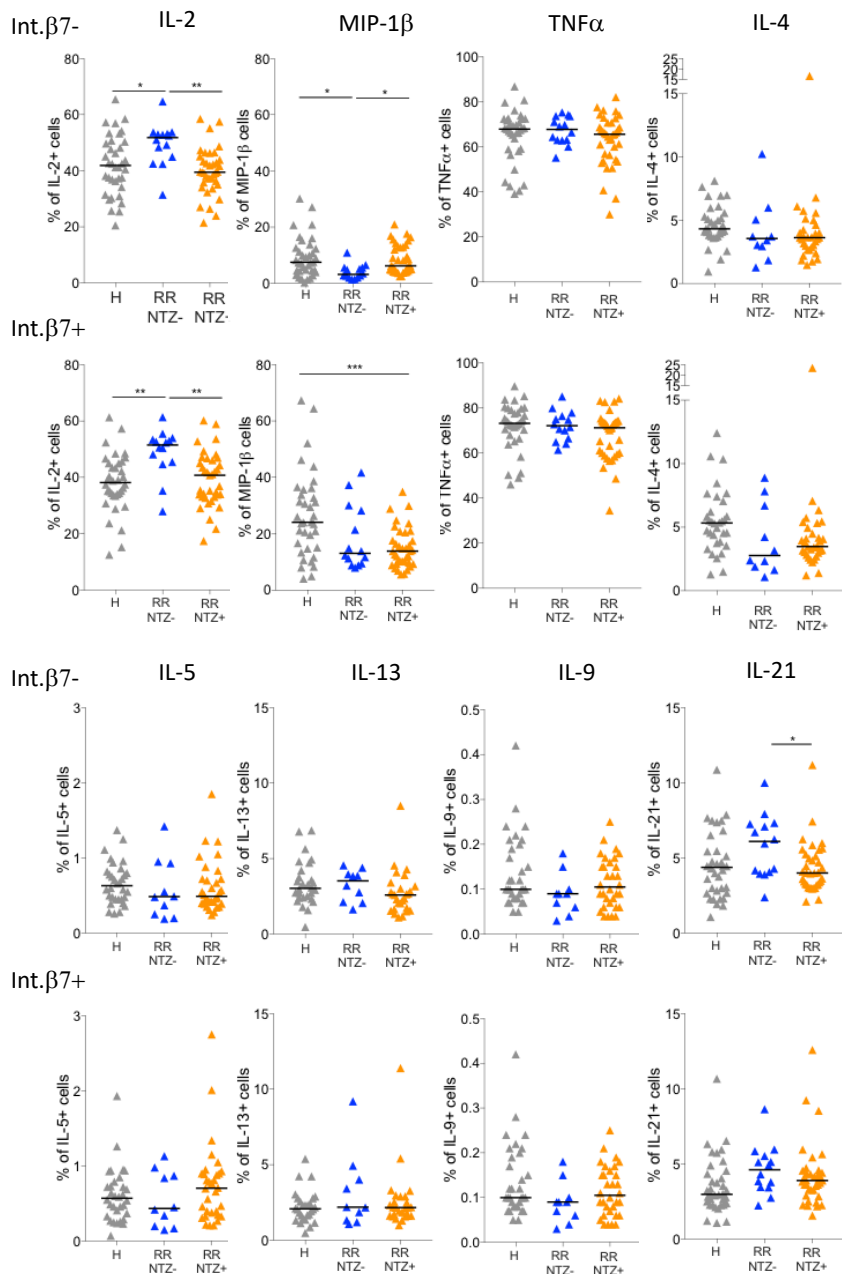
Median of fluorescence intensity of integrin  $\alpha$ <sup>4</sup> on integrin  $\beta$ <sup>7</sup>- and integrin  $\beta$ <sup>7</sup>+ memory CD4 T cells expressing integrin  $\alpha$ <sup>4</sup>.



**Supplementary Figure 2: A higher proportion of integrin  $\beta$ <sup>7</sup>- et integrin  $\beta$ <sup>7</sup>+ memory CD4 T cells from RRMS NTZ- patients express IL-2 compared to healthy donors.**

Percentages of integrin  $\beta$ <sup>7</sup>- and integrin  $\beta$ <sup>7</sup>+ memory CD4 T cells expressing IL-2, GM-CSF, IL-17A, IL-17F, IL-4, IL-5, IL-9, IL-21 in healthy donors and RRMS NTZ- patients.





**Supplementary Figure 3: A lower proportion of integrin β7- et integrin β7+ memory CD4 T cells from RRMS NTZ+ patients express IL-2 compared to RRMS NTZ- patients.**

Percentages of integrin β7- (top rows) and integrin β7+ (bottom rows) memory CD4 T cells expressing IL-2, MIP-1β, TNFα, IL-4, IL-5, IL-13, IL-9 and IL-21 in healthy donors, RRMS NTZ- and RRMS NTZ+ patients.

## Projet 2 : Implication des TFh dérivant de l'intestin dans la physiopathologie de la SEP

### Résumé

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire neurodégénérative auto-immune chronique causée par la destruction de la myéline et des tissus collatéraux associés du système nerveux central (SNC). Il n'existe pas de traitement efficace pour les formes les plus invalidantes de la SEP (formes progressives). Les études sur les modèles murins de la SEP ainsi que sur les échantillons de patients ont établi que les lymphocytes T CD4 (LT CD4) sont une composante immunitaire centrale de la pathogenèse de la SEP. Il a également été montré chez la souris que les altérations de la composition du microbiote intestinal modifient largement la susceptibilité à la maladie en altérant les propriétés des LT CD4 intestinaux mais également de ceux localisés dans le SNC. Les études réalisées dans des modèles murins de plusieurs pathologies autoimmunes ayant montré que les lymphocytes intestinaux pouvaient migrer dans les organes cibles et participer à la pathogénèse de ces maladies, nous nous sommes intéressés aux LT CD4 intestinaux et à leur éventuelle pathogénicité chez les patients atteints de SEP. L'obtention d'échantillons de tissus intestinaux chez les patients étant éthiquement difficile, nous avons étudié les caractéristiques des lymphocytes intestinaux à partir de prélèvements sanguins en les identifiant par leur expression de l'intégrine  $\beta 7$ .

Dans un premier temps, nous avons étudié le phénotype et les propriétés inflammatoires des LT CD4 exprimant l'intégrine  $\beta 7$  (LT CD4 int $\beta 7^+$ ) chez les sujets sains afin de pouvoir les caractériser. Nous avons observé que les LT CD4 int $\beta 7^+$  ont un profil plus inflammatoire comparés aux LT CD4 int $\beta 7^-$ . Nous avons également pu mettre en évidence que les LT CD4 folliculaires (TFh) dérivant de l'intestin (TFh int $\beta 7^+$ ), induisent une bien plus faible sécrétion d'immunoglobulines de types G et A et différenciation des LB naïfs en plasmocytes comparés aux TFh int $\beta 7^-$ . Cette différence d'efficacité dans l'aide aux LB n'est pas due à une différence de sécrétion d'IL-21 ni à une différence d'expression des molécules ICOS, OX40, CD40L et PD-1. Chez les patients SEP, nous avons observé que les TFh int $\beta 7^+$  des patients SPMS mais non RRMS ont une capacité à aider les LB comparable à celle des TFh int $\beta 7^-$  des donneurs sains. Ce résultat suggère que les TFh dérivés de l'intestin pourraient participer à la formation et / ou au maintien des centres germinatifs ectopiques, retrouvés dans les méninges de 40% des patients SPMS et dont la présence corrèle avec la gravité de la maladie.

Les études menées *in vitro* ainsi que dans les modèles murins de la SEP ont montré que les lymphocytes franchissent la barrière hémato-encéphalique (BHE) grâce à l'interaction des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et  $\alpha L\beta 2$  avec leurs ligands respectifs VCAM-1 et ICAM-1 exprimés par les cellules endothéliales de la BHE. Nous avons observé que les LT CD4 int $\beta 7^+$  expriment l'intégrine  $\alpha L\beta 2$  mais aussi de faibles

niveaux d'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ . *In vitro*, nous avons déterminé que les LT CD4 int $\beta 7^+$  incluant les TFh sont capables de migrer à travers une monocouche de cellules endothéliales de la BHE de manière dépendante de l'interaction  $\alpha L\beta 2/ICAM-1$  et  $\alpha 4\beta 1/VCAM-1$ . Parmi les sous populations de LT CD4, nous avons déterminé que ce sont les lymphocytes Th1/17, particulièrement ceux exprimant l'intégrine  $\beta 7$ , qui migrent le plus efficacement dans notre système. Ces données sont en accord avec la détection de LT CD4 exprimant des marqueurs d'adressage intestinal dans le SNC de patients notamment SEP et soutiennent un rôle pathogénique des LT CD4 dérivés de l'intestin incluant les TFh dans la SEP.

## Matériel et Méthodes

### Échantillons de patients SEP et sujets sains

Cette étude a été réalisée à partir d'échantillons de sang de patients SEP du service de neurologie du centre hospitalo-universitaire (CHU) de Bordeaux. Les patients sont inclus dans le protocole T4MS en fonction de leur phase (RRMS, SPMS et PPMS). Tous les participants à l'étude ont signé un consentement avant inclusion. Les prélèvements de sang des sujets sains sont obtenus auprès de l'Établissement Français du Sang (EFS, Bordeaux). Pour l'étude comparative avec les patients SEP, nous avons utilisé des tubes de sang contenant de l'EDTA (Éthylènediaminetétraacétique) de sujets sains de même âge et même sexe. Les expériences nécessitant un grand nombre de cellules de sujets sains, incluant les études fonctionnelles, sont réalisées à partir de couches leuco-plaquettaires (CLP) obtenues auprès de l'EFS.

### Phénotypage par cytométrie en flux

Les cellules mononucléées du sang périphérique (PBMC pour peripheral blood mononuclear cell) sont isolées par la technique de Ficoll. L'expression des marqueurs de surface est étudiée sur des PBMC fraîchement isolées pour les patients SEP et les sujets sains. Le phénotype des non-TFh et TFh circulants est étudié par cytométrie en flux (BD LSRFortessa) avec les anticorps anti-intégrine  $\beta 7$  PE (clone FIB504), anti-CD4 APC-Cy7 (clone OKT4), anti-CXCR3 BV421 (clone G025H7), anti-CCR6 BV605 (clone G034E3), anti-ICOS PE-Cy7 (clone C3984A), anti-CD226 FITC (clone 11A8) et anti-PD-1 BV711 (clone EH122H7) de Biolegend. Les anticorps anti-CD3 A700 (clone UCHT1), anti-CXCR5 A647 (clone RF8B2), et anti-CD161 BV711 (clone 563865), anti-HLA-DR BV711 (clone 6466) et anti-CD69 PE-Cy7 (clone FN50) proviennent de BD Biosciences et anti-TIGIT APC (clone MBSA43) d'eBiosciences. L'anticorps anti-CD45RA ECD (clone 2H4LDH11LDB9) vient de Beckman Coulter et le marqueur de viabilité Zombie Aqua™ Fixable viability kit de Biolegend. Les PBMC sont incubés 15min à température ambiante (RT) en présence des anticorps, puis lavés avec du PBS (tampon phosphate salin) avant d'être remis en suspension dans du tampon de FACS (PBS, 2mM EDTA, 5% sérum de veau fœtal (SVF)). Pour le marquage intracellulaire avec l'anticorps anti-Ki67 FITC (clone B56) de BD Biosciences, les cellules sont fixées et perméabilisées avec la solution du kit BD Cytotfix/Cytoperm™ pendant 10 minutes, puis sont marquées pendant 30 minutes à RT avant lavage et remises en suspension dans du tampon FACS.

L'identification des TFr circulants chez les sujets sains est effectuée à partir de PBMC congelées provenant de CLP. Après décongélation, les PBMC sont marquées avec les anticorps de surface anti-CD3 BV786 (clone OKT3), anti-CD4 A700 (clone RPAT4), anti-CXCR5 PE-Cy7 (clone J252D4), anti-CD25 BV421 (clone BC96), anti-intégrine  $\beta 7$  biotine (clone FIB504), anti-CD127 BV605

(clone A019D5) de Biolegend, anti-PD-1 APC (clone eBioJ105) de eBiosciences, l'anti-CD45RA ECD, et le marqueur de viabilité Zombie Aqua™ durant 15 minutes à RT. Après lavage avec du PBS, les PBMC sont incubées avec de la streptavidine BB515 (BD Biosciences) pendant 10 minutes à RT. Après lavage, les PBMC sont perméabilisées avec la solution de Fixation/perméabilisation du kit Transcription-factor Buffer Set (BD Pharmingen™) durant 45 minutes à 4°C. Les PBMC sont ensuite lavées 2 fois avec la solution de Perm/Wash™ Buffer contenue dans le kit et marquées avec les anticorps anti-FOXP3 PE (clone 259D/C7, BD Biosciences) et anti-CTLA4 APC (clone L3D10) de Biolegend, durant 40 minutes à RT. Après 2 lavages avec la solution de Perm/Wash™ Buffer, les PBMC sont remises en suspension dans du tampon FACS.

## Profil cytokinique

### Marquage intracellulaire des cytokines

L'étude de l'expression des cytokines est effectuée sur des PBMC congelées de donneurs sains et patients SEP. Après décongélation, une stimulation polyclonale des PBMC est réalisée avec du phorbol myristate acétate (PMA) et de la ionomycine afin d'étudier la capacité des LT CD4 à produire l'IL-10, l'IFN $\gamma$ , le GM-CSF, le TNF $\alpha$ , l'IL-21, l'IL-2, l'IL-17F, l'IL-17A et MIP-1 $\beta$ . Pour cela, les PBMC sont mises en culture dans une plaque 96 puits de 1ml (1x10<sup>6</sup> cellules/1ml/puits) en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) complet (supplémenté avec 10% de SVF, 25 $\mu$ M d'hépès, 1% d'acides aminés non essentiels, 1mM de pyruvate de sodium, 2mM de L-glutamine, 100U/ml de pénicilline, 100U/ml de streptomycine, 50 $\mu$ M de  $\beta$ -mercapthoéthanol) contenant de la PMA (à 25ng/mL, Sigma Aldrich) et de la ionomycine (à 1 $\mu$ g/mL, Sigma Aldrich), puis incubées à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Après 1h30 d'incubation, le transport vers l'appareil de Golgi et le réticulum endoplasmique rugueux est stoppé par l'ajout de Brefeldine A (5 $\mu$ g/mL, eBioscience) et de la Monensine (0,66 $\mu$ L/mL, Golgistop, BD Biosciences) dans les puits de culture afin de retenir les cytokines au niveau du cytoplasme et les cellules sont remises à incuber 3h30. Les cellules sont ensuite marquées avec des anticorps dirigés contre les molécules de surface pour permettre l'identification du type de cellules productrices des cytokines d'intérêt : anti-CD226 FITC (clone 11A8) de Biolegend, anti-CD8 ECD (clone SFC121Thy2D3) de Beckman Coulter, anti-CXCR5 BV421 (clone J252D4), anti-CD3 A700 (clone UCHT1) et anti-intégrine  $\beta$ 7 BV605 (clone FIB504) de BD Biosciences et anti-TIGIT APC (clone MBSA43) d'eBioscience. Les cellules sont ensuite incubées pendant 10 minutes avec une solution de fixation et perméabilisation du kit BD Cytotfix/Cytoperm™ de BD Biosciences avant le marquage avec plusieurs panels d'anticorps dirigés contre les cytokines dans le tampon de perméabilisation (Permwash - kit BD Cytotfix/Cytoperm™) : anti-GM-CSF PerCPCy5.5 (clone BVD2-21C11), anti-TNF $\alpha$  PE-Cy7 (clone MAB11), anti-IFN $\gamma$  BV786 (clone 4SB3), anti-IL10 PE-Cy7 (clone JES3-9D7), anti-IL-2 A700 (clone MQ117H12), anti-IL-17A BV705 (clone BL168), anti-IL-4 PE-Cy7 (clone MP4-25D2), anti-IL-22 PerCPCy5.5 (clone 2G12A41), anti-CD45RA APC-Cy7 (clone HI100) de Biolegend, anti-IL-21 PE

(clone 3A3N21), anti-IL-17F BV650 (clone 033782), anti-MIP-1 $\beta$  PE (clone D21-1351), et anti-IL-13 BV711 (clone JES105A2) de BD Biosciences, pendant 30 minutes à RT. Les cellules sont lavées deux fois avec la solution de Permashield puis sont reprises dans du tampon FACS pour le passage en cytométrie en flux.

### **Dosage de l'IL-21 humaine par la technologie Luminex**

La technologie Luminex consiste à utiliser des microsphères d'un diamètre de 6,5microns, avec un noyau magnétique et une surface en polystyrène, associées à une proportion de fluorochromes rouge et infrarouge permettant d'obtenir une signature spectrale unique pour chaque microsphère. Les microsphères vont être ensuite couplées à des anticorps spécifiques pour un analyte, ici l'IL-21. Nous avons obtenu les microsphères couplées à un anticorps anti-IL-21 mises au point au Baylor Institute for Immunology Research, aux Etats-Unis (USA)<sup>452</sup>. Dans leur procédure, les billes SeroMAP (région 47) ont été utilisées avec un couplage optimal de  $1 \times 10^7$  billes à  $5 \mu\text{g}$  d'anticorps dans  $500 \mu\text{L}$  de tampon MES à  $50 \text{mM}$  et  $\text{pH } 5,0$ . La biotinylation de l'anticorps secondaire a été effectuée avec le réactif NHS-LC biotine (25X, Pierce) et cet anticorps est utilisé à  $0,5 \mu\text{g/mL}$  dans l'essai. La Phycolink Streptavidine R-Phycoérythrine à  $2 \mu\text{g/mL}$  (PJ31S de Prozyme), a été utilisée comme rapporteur. A partir de surnageant dont la concentration d'IL-21 est connue (surnageant de PBMC stimulées avec de la PMA/ionomycine contenant de l'IL-21 natif) provenant du même laboratoire (USA), nous avons réalisé notre gamme étalon en utilisant nos surnageants de culture de PBMC stimulées avec l'entérotoxine B staphylococcique (SEB,  $0,1 \mu\text{g/mL}$ , Toxin technology) à  $2,5 \times 10^6$  cellules/mL pendant 2 jours. Après avoir établi la concentration d'IL-21, ces surnageants sont ensuite utilisés comme standard pour l'ensemble de nos expériences.  $35 \mu\text{L}$  de surnageant de co-culture LB :LT ou stimulés avec des billes CD3/CD28, préalablement recueillis après 2 jours de culture et congelés à  $-80^\circ\text{C}$ , sont incubés avec  $35 \mu\text{L}$  de solution contenant 3200 microsphères conjuguées avec l'anticorps anti-IL-21 dans du tampon Luminex (DPBS, 1% BSA, 0,05% Tween 20) par puits (plaque noire à fond plat transparent, Thermo Scientific™). Pour la gamme,  $35 \mu\text{L}$  de dilutions en série d'un facteur 3,5 dans du tampon Luminex du surnageants de PBMC étalons, et  $35 \mu\text{L}$  de microsphères (3200 billes/puits) sont déposés dans la plaque. Les échantillons sont ensuite incubés 4 heures dans l'obscurité et sous agitation. Après trois lavages avec du tampon Luminex,  $75 \mu\text{L}$  de la solution d'anticorps secondaire biotinylé ( $0,5 \mu\text{g/mL}$ ) sont ajoutés dans chaque puits, puis la plaque est incubée dans l'obscurité et sous agitation pendant 1h30. Une série de lavage est ensuite effectuée avant l'ajout de  $75 \mu\text{L}$  de la solution de Phycolink Streptavidine R-Phycoérythrine (à  $2 \mu\text{g/mL}$ , diluée dans du tampon Luminex) pendant 30min sous agitation et dans l'obscurité. Les billes sont ensuite lavées et la lecture peut être réalisée à l'aide du Bio-Plex reader (MAGPIX Biorad). L'analyse est effectuée avec le logiciel Bio-Plex Manager.

## Co-culture LT CD4:LB

Les différentes populations étudiées sont isolées à partir de PBMC congelées provenant de CLP pour les expériences réalisées exclusivement sur donneurs sains. Pour les co-cultures LT CD4:LB comparant les propriétés des TFh de patients SEP et de donneurs sains, celles-ci sont réalisées à partir de PBMC congelées isolées de tubes de sang de patients SEP et de sujets sains, appariés selon l'âge et le sexe.

### **Purification des sous-populations de LB**

Les LB sont isolés par sélection positive (CD19 microbeads, Miltenyi) à l'aide de microbilles magnétiques couplées à un anticorps anti-CD19. La fraction des cellules non retenues par l'aimant est utilisée pour l'enrichissement en LT CD4 mémoires (cf purification des sous populations des LT CD4). Les cellules fixées sur les microbilles couplées à l'anti-CD19 retenues dans la colonne sont éluées, comptées et marquées avec des anticorps anti-IgD FITC (clone IA6-2), anti-CD27 PE (clone L128) et anti-CD3 A700 (clone UCHT1) provenant de BD Biosciences. En fonction des expériences réalisées, différentes populations de LB sont ensuite purifiées par tri en cytométrie en flux (Trieur BD FACSAria) : LB naïfs (CD3-, CD27-, IgD+) et LB mémoires (CD3-, CD27+, IgD-). La pureté des populations triées est supérieure à 95 %.

### **Purification des sous-populations de LT CD4**

A partir de la fraction négative du tri des LB, les LT CD4 mémoires sont isolés par tri-immunomagnétique (Memory CD4+ T cell isolation kit, Miltenyi). La fraction négative, contenant les LT CD4 mémoires est ensuite marquée avec des anticorps de surface adaptés à l'expérience. Le tri cellulaire en cytométrie en flux (Trieur BDFACSAria) pour les co-cultures avec les TFh int $\beta$ 7+ nécessite un marquage avec les anticorps suivants : anti-CD4 A700 (clone RPA-T4), anti-CD45RA APC-Cy7 (clone HI100), anti-intégrine  $\beta$ 7 PE (clone FIB504), anti-CD56 FITC (clone HCD56), anti-CD8 FITC (clone RPA-T4) de Biolegend et anti-CXCR5 A647 (clone RF8B2) de BD Biosciences. A partir des cellules CD4+, CD45RA-, CD56- et CD8-, les cTFh (CXCR5+) et non-cTFh (CXCR5-) provenant (intégrine  $\beta$ 7+) ou non (intégrine  $\beta$ 7-) de l'intestin sont ainsi isolés.

Pour les co-cultures TFh int $\beta$ 7+, CCR9+ et GPR15+, les anticorps utilisés sont : anti-CD4 A700, anti-CD45RA APC-Cy7, anti-CD56 FITC, anti-CD8 FITC, anti-GPR15 BV421 (clone SA302A10), anti-CCR9 PE-Cy7 (clone L053E8) de Biolegend et anti-intégrine  $\beta$ 7 BV605 (clone FIB504), anti-CXCR5 A647 de BD Biosciences. A partir des cellules CD4+, CD45RA-, CD56- et CD8-, les cTFh CXCR5+int $\beta$ 7+, cTFh CXCR5+int $\beta$ 7-, les cTFh CXCR5+int $\beta$ 7+CCR9+, les cTFh CXCR5+int $\beta$ 7+GPR15+, les cTFh CXCR5+int $\beta$ 7-GPR15+, les cTFh CXCR5+int $\beta$ 7+CCR9-GPR15- et les non-cTFh (CXCR5-) provenant (intégrine  $\beta$ 7+) ou non (intégrine  $\beta$ 7-) de l'intestin sont ainsi isolés. La population de cTFh CCR9+ parmi les cTFh n'exprimant pas l'intégrine  $\beta$ 7 étant présente en très faible proportion, celle-ci n'est pas isolée.

Pour les co-cultures avec les sous-types de TFh, les anticorps suivants sont utilisés : anti-CD4 A700, anti-CD45RA APC-Cy7, anti-intégrine  $\beta 7$  PE, anti-CD56 FITC, anti-CD8 FITC, anti-CXCR3 BV421, anti-CCR6 BV605 et anti-CXCR5 A647. A partir des cellules CD4+, CD45RA-, CD56- et CD8-, les différents sous-types de cTFh exprimant ou pas l'intégrine  $\beta 7$  (cTFh1, cTFh2, cTFh17 et cTFh1/17) sont isolés en fonction de l'expression des marqueurs CCR6 et CXCR3.

Pour les co-cultures TFh int $\beta 7$ + et int $\beta 1$ +, les LT CD4 mémoires sont divisés en deux. La moitié des cellules est marquée avec les anticorps décrits précédemment pour les co-cultures TFh int $\beta 7$ + et les cTFh (CXCR5+) et non-cTFh (CXCR5-) exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  sont isolés par cytométrie en flux. La seconde moitié des cellules est marquée avec les anticorps suivants : anti-CD4 A700, anti-CD45RA APC-Cy7, anti-intégrine  $\beta 1$  FITC (clone TS2/16) de Biolegend et anti-CXCR5 A647. A partir des CD4+, CD45RA-, les cTFh (CXCR5+) et non-cTFh (CXCR5-) exprimant ou non l'intégrine  $\beta 1$  sont ensuite isolés par cytométrie en flux.

### **Co-culture autologue des LT CD4 et LB**

Chaque population de LT CD4 mémoires d'intérêt et LB naïfs du même donneur sain sont mis en culture selon un ratio 1:1. Les cellules sont placées dans des plaques de 96 puits à fond rond pour faciliter l'interaction entre les LB et LT CD4 ( $1 \times 10^4$  LT CD4 avec  $1 \times 10^4$  LB naïfs) dans un volume final de 200 $\mu$ L de RPMI complet. Pour favoriser le contact entre le CMHII des LB et le TCR des LT CD4, un super-antigène, le SEB (1 $\mu$ g/mL, Toxin technology) est ajouté dans chaque puits de culture. Après 12 jours de culture, les surnageants de culture sont récoltés et stockés ensuite à -80°C et les cellules sont marquées avec les anticorps anti-CD4 PB (clone RPAT4), anti-CD38 PE-Cy7 (clone HIT2), anti-CD138 APC (clone MI15) provenant de Biolegend, anti-CD19 ECD (clone 53119) de Beckman Coulter, anti-CD3 A700 (clone UCHT1) de BD Biosciences et le marqueur de viabilité Zombie Aqua™ pour analyser la différenciation des LB en plasmablastes et plasmocytes. Pour l'étude de la cinétique d'expression des molécules impliquées dans l'interaction LT CD4:LB, les cellules sont récoltées aux temps indiqués et les anticorps anti-CD40L PE (clone 2431), anti-ICOS FITC (clone C398.4A), anti-OX40 APC-Cy7 (clone ACT35), anti-PD-1 BV711 (clone EH122H7) de Biolegend, anti-CD27 BV650 (clone M-T271), anti-CD69 PE-Cy7 (clone FN50) et anti-CD28 APC (clone CD28.2 RUO) de BD Biosciences sont ajoutés au panel.

Pour le passage en cytométrie, les cellules sont remises en suspension dans 200 $\mu$ L de tampon FACS contenant des microbilles fluorescentes de comptage (CountBright, Invitrogen) à raison de 10 $\mu$ L de la solution de billes/200 $\mu$ L, correspondant à un nombre entre  $1 \times 10^4$  et  $1,2 \times 10^4$  de billes selon le lot, permettant ainsi de déterminer le nombre de cellules par échantillon.



## Co-culture allogénique des LT CD4 et LB

Les co-cultures allogéniques sont réalisées avec les LT CD4 de patients SEP ou de donneurs sains, triés par cytométrie en flux (cTFh  $\beta$ 7+, cTFh  $\beta$ 7-, non-cTFh  $\beta$ 7+ et non cTFh  $\beta$ 7-), sans enrichissement préalable en LT mémoires, qui sont mis en culture avec des LB naïfs (CD3-CD27-IgD+) de CLP selon un ratio 1:1 ( $1 \times 10^4$  LT et  $1 \times 10^4$  LB naïfs/puits) et stimulés avec du SEB ( $1 \mu\text{g/mL}$ ).

## ELISA

Les concentrations d'IgM, IgG et IgA dans les co-cultures LT CD4 :LB sont déterminées par ELISA. Les puits d'une plaque de 96 puits à fond plat sont pré-recouverts avec un anticorps de capture anti-IgM, anti-IgG ou anti-IgA à  $4 \mu\text{g/mL}$  de Southern Biotechnology, durant la nuit. Les surnageants de co-cultures prélevés à 12 jours sont dilués et déposés dans les puits pendant 2 heures. Après rinçage avec du PBS 0,05% Tween 20, les anticorps secondaires anti-IgM-HRP, anti-IgG-HRP et anti-IgA-HRP (dilution 1/4000) sont ajoutés et incubés durant 1 heure. Après lavage, le substrat TMB (tétraméthylbenzidine, Sigma) est ensuite déposé dans chaque puits et la coloration est stoppée, avant la lecture au Varioskan de Thermo Scientific (DO à 450nm et 570nm), par l'ajout d'une solution d' $\text{H}_2\text{SO}_4$  2N.

## Stimulation des PBMC avec des billes anti-CD3/CD28

Les différentes populations de LT CD4 mémoires et les LT CD4 naïfs préalablement triées en cytométrie en flux sont stimulées avec des billes anti-CD3/CD28 ( $2 \mu\text{L}$  de billes/ $200 \mu\text{L}$  soit 4 billes/10 cellules, Dynabeads™ Gibco) dans des plaques 96 puits à fond rond ( $5 \times 10^4$  cellules) dans du milieu RPMI complet durant 2 jours. Les surnageants sont ensuite récoltés et stockés à  $-80^\circ\text{C}$  pour l'analyse de l'IL-21 par Luminex.

## Culture cellulaire de cellules endothéliales de la BHE

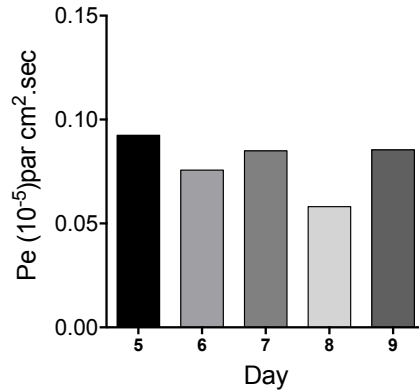
La lignée cellulaire hCMEC/D3 (human cerebral microvascular endothelial cell line) est utilisée comme modèle de la BHE chez l'homme<sup>453</sup>. La lignée de cellules endothéliales hCMEC/D3 (Cedarlane) est cultivée à  $37^\circ\text{C}$  avec 5% de  $\text{CO}_2$  dans un milieu complet Endothelial Basal Medium (EBM-2, Lonza) supplémenté avec 5% de SVF,  $5 \mu\text{g/mL}$  d'acide ascorbique, 1% de concentré de lipides,  $1 \text{ng/mL}$  de bFGF (human Basic Fibroblast Growth Factor),  $1,4 \mu\text{M}$  d'hydrocortisone, 10mM d'hépès, 100U/mL de pénicilline et 100U/mL de streptomycine, dans des flasques T75 ( $3 \times 10^4$  cellules/ $\text{cm}^2$ ) préalablement recouvertes de collagène de type I de rat à faible viscosité (Cultrex® Rat Collagen, R&D Systems) à  $150 \mu\text{g/mL}$ . Le milieu est changé tous les 2 jours. Pour vérifier le phénotype de la lignée cellulaire hCMEC/D3 avant les expériences, les cellules endothéliales sont mises en culture à  $1 \times 10^5$  cellules/ $\text{cm}^2$  dans des plaques 6 puits, avec ou sans  $\text{TNF}\alpha$  à 100U/mL (PeproTech) pendant 24 et 48h, et marquées

en utilisant les anticorps anti-ICAM-1 (clone HA58), anti-ICAM-2 (clone CBR-IC2/2), anti-VCAM-1 (clone STA) et anti-sélectine-P (clone AK4) de Sony.

### Test de perméabilité des hCMEC/D3

Les cellules endothéliales hCMEC/D3 dérivées de la BHE sont cultivées sur un insert poreux en polyéthylène téréphtalate (Inserts Falcon®, Dutscher, pores de 3µm), pré-recouvert de collagène de type I, à  $4,5 \times 10^4$  cellules/cm<sup>2</sup> dans du milieu EBM-2 complet. Les inserts de culture sont déposés sur des plaques 12 puits (plaque Companion, Dutscher) comprenant 1ml de milieu EBM-2 complet, créant ainsi une chambre supérieure (insert) et inférieure, durant 7 jours, à 37°C avec 5% CO<sub>2</sub>, pour que les cellules soient à confluence. Le milieu de culture est changé tous les 2 jours.

La perméabilité de la monocouche de hCMEC/D3 dans les inserts a été testée à l'aide de Fluorescein isothiocyanate-Dextran (FITC-Dextran, 70kDa, Sigma Aldrich). Après avoir surveillé la confluence des cellules endothéliales sur l'insert, du FITC-Dextran (2mg/ml), dilué dans le milieu de culture EBM-2, est déposé sur la chambre supérieure. Le passage à travers la monocouche de hCMEC/D3 est surveillé par le prélèvement d'échantillons dans la chambre inférieure à des intervalles de 5 minutes sur une durée totale de 30 minutes (6 points temporels). Ces échantillons sont lus dans des plaques optiques pour déterminer l'intensité de la fluorescence. Les valeurs obtenues vont servir à établir une courbe de fluorescence en fonction du temps, utilisés pour calculer le coefficient de perméabilité ( $P_e$ ). Certains inserts ont été pré-recouverts de collagène de type I mais pas de cellules endothéliales pour permettre d'évaluer le taux de passage du FITC-Dextran à travers le filtre seul, nécessaire au calcul du  $P_e$ . Avec  $P_e = PS/s$ , où  $PS$  (clairance) est la surface de perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales et  $s$ , la surface du filtre utilisé.  $PS$  est calculée par l'équation  $1/PS = 1/m_e - 1/m_f$ , où  $m_e$  représente la pente de la courbe avec les cellules endothéliales et  $m_f$ , la pente de la courbe avec le filtre uniquement. Les courbes sont réalisées avec les valeurs de la clairance et du temps. La clairance est calculée par  $(AU_a - AU_b)/F_i$ , avec  $AU_a$  correspondant à la fluorescence totale du FITC-Dextran au niveau de la chambre inférieure,  $AU_b$  représentant la fluorescence de fond et  $F_i$ , la fluorescence de la solution initiale déposée dans la chambre supérieure.



**Figure 25: Validation du modèle de transmigration avec les cellules endothéliales hCMEC/D3.**

Le graphe représente les valeurs du coefficient de perméabilité (Pe) de la monocouche de cellules endothéliales hCMEC/D3, sur l'insert de culture, à 5, 6, 7, 8 et 9 jours de culture.

La perméabilité de la monocouche de cellules endothéliales a été évaluée, en calculant le coefficient de perméabilité (Pe) à 5, 6, 7, 8 et 9 jours de culture sur l'insert (**Figure 25**). La valeur du Pe est relativement stable entre les différents jours testés, et l'ajout de TNF $\alpha$  dans la culture pendant 24h, pour stimuler les cellules endothéliales, n'impacte pas la valeur du Pe (non montré). En fonction des résultats obtenus, nous avons pu déterminer nos conditions expérimentales.

### Transmigration des LT CD4

Après 6 jours de culture, les cellules endothéliales sur les inserts de culture sont activées avec du TNF $\alpha$  (100U/mL) dans du milieu EBM-2 complet pendant 24h. En parallèle, les LT CD4 mémoires sont isolés en tri-immunomagnétique (Memory CD4+ T cell isolation kit, Miltenyi) à partir de PBMC congelées provenant de CLP. Après obtention des LT CD4 mémoires dans la fraction négative, les cellules sont marquées par les anticorps anti-CD4 A700, anti-CD45RA APC-Cy7, anti-CD56 FITC, anti-CD8 FITC, anti-CXCR3 BV421 et anti-CCR6 BV605 afin de trier les sous-populations de LT CD4 avec le BD FACSAria. A partir des CD4+, CD45RA-, CD56- et CD8-, les Th1 (CCR6-, CXCR3+), les Th2 (CCR6- CXCR3-), les Th17 (CCR6+CXCR3-) et les Th1/17 (CCR6+, CXCR3+) sont isolés par cytométrie en flux. La pureté de l'ensemble des populations triées est supérieure à 95 %. Après lavage avec du PBS et comptage des cellules obtenues, les différentes populations cellulaires sont marquées séparément avec du CTV (CellTrace violet, ThermoFisher scientific) à 1 $\mu$ M/mL (pour 1x10<sup>7</sup> cellules/mL maximum) pendant 8 minutes dans l'obscurité et à RT. Après trois lavages avec du milieu RPMI complet, les cellules sont comptées et mises en culture avec des PBMC non marquées et non triées provenant du même donneur (5x10<sup>6</sup> cellules/mL contenant 1x10<sup>6</sup> cellules d'intérêt marquées au CTV et 4x10<sup>6</sup> de PBMC) en présence de billes anti-CD3/CD28 (10 $\mu$ L de la solution de billes/mL, soit 8 billes/100 cellules) pendant la nuit à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Les billes anti-CD3/CD28 sont ensuite enlevées à l'aide d'un aimant et les cellules (PBMC + population d'intérêt CTV) sont comptées et reprises à 1x10<sup>6</sup>

cellules/500 $\mu$ L de milieu « mixte RPMI » (RPMI, 2mM de L-glutamine, 5% de SVF, 5 $\mu$ g/mL d'acide ascorbique, 1% de concentré de lipides, 1ng/mL de bFGF, 10mM d'hépès, 100U/mL de pénicilline et 100U/mL de streptomycine) en accord avec l'étude de Strazza et al., 2016<sup>454</sup>. Les PBMCs sont déposées délicatement dans la chambre supérieure correspondant à l'insert de culture où se trouve la monocouche de cellules endothéliales hCMEC/D3 préalablement lavée avec du PBS. 1mL de milieu « mixte RPMI » est déposé dans la chambre inférieure, où vont se situer les cellules ayant migré. Les inserts et plaques de culture sont ensuite mis à 37°C, avec 5% CO<sub>2</sub> et la migration des PBMC est évaluée après 8 heures (temps optimal de migration, déterminé par des tests préliminaires), par cytométrie en flux. Plusieurs rinçages sont effectués pour récolter l'ensemble des cellules ayant migré avec du PBS. La chambre supérieure est également rincée avec du PBS contenant 0,1M d'EDTA pour détacher toutes les PBMC adhérentes. Les milieux de culture contenant les PBMC de la chambre supérieure et inférieure sont marqués avec les anticorps anti-CD4 BV786, anti-CD45RA APC-Cy7, anti-intégrine  $\beta$ 7 PE, anti-intégrine  $\beta$ 1 FITC, anti-CXCR5 A647, anti-CD20 A700 (clone 2H7, BD Biosciences) et le marqueur de viabilité Zombie Aqua™. Les Th1, Th2, Th17 et Th1/17 ayant migré à travers la monocouche de cellules endothéliales sont identifiés par le marquage CTV en cytométrie en flux. Pour le passage en cytométrie, les cellules sont suspendues dans 200 $\mu$ L de tampon FACS contenant des microbilles fluorescentes de comptage (CountBright, Invitrogen).

Le nombre de cellules ayant et n'ayant pas migré est déterminé pour chaque sous-type de LT CD4 et le pourcentage de migration est déterminé selon la formule ((nombre de cellules présentes dans la chambre inférieure /le nombre total de cellules, chambre supérieure et inférieure) x 100).

### Transmigration des LT CD4 avec des anticorps bloquants

Pour l'étude des molécules impliquées dans la transmigration des LT CD4 à travers la BHE, les LT CD4 mémoires exprimant ou non l'intégrine  $\beta$ 7 (LT CD4  $\beta$ 7+, LT CD4  $\beta$ 7-) sont triées par cytométrie à partir de cellules enrichies en LT CD4 mémoires. Les 2 populations sont comptées et marquées avec du CTV pour les LT CD4  $\beta$ 7+ et du CFSE (Invitrogen) pour les LT CD4  $\beta$ 7-, avant d'être remises ensemble en culture avec des PBMC totaux provenant du même donneur (5x10<sup>6</sup> cellules/ml contenant 5x10<sup>5</sup> LT CD4  $\beta$ 7-, 1,5x10<sup>5</sup> LT CD4  $\beta$ 7+ et 4,35x10<sup>6</sup> PBMC) et stimulées par des billes anti-CD3/CD28 (10 $\mu$ L billes/5x10<sup>6</sup> cellules/mL) pendant la nuit. Les PBMC sont ensuite comptées et pré-incubées avec les anticorps bloquants anti-intégrine  $\beta$ 1 (clone P2D5) de R&D system ou avec un anticorps anti-CD18 (clone TS1/18) à 1 $\mu$ g/mL, de Biolegend, dans du milieu « mixte RPMI » (2x10<sup>6</sup> cellules/mL) pendant 1heure à 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Après incubation, 500 $\mu$ L de milieu contenant les cellules et l'anticorps bloquant étudié sont déposés délicatement dans la chambre supérieure (insert de culture) pendant 8 heures à 37°C et 5% CO<sub>2</sub>. Chaque anticorps bloquant est utilisé avec son isotype contrôle.

L'évaluation de la transmigration des LT CD4  $\beta 7^+$  et des LT CD4  $\beta 7^-$  est réalisée à partir de leur marquage CTV et CFSE en cytométrie en flux. Des billes de comptage sont également ajoutées et le pourcentage de migration est déterminé comme précédemment.

## Microarray

A partir de PBMC de CLP, les 4 populations (cTFh  $\beta 7^+$ , cTFh  $\beta 7^-$ , non-cTFh  $\beta 7^+$  et non cTFh  $\beta 7^-$ ) et les LB naïfs ont été triés par cytométrie en flux comme précédemment. Une partie des cellules triées a été directement mise dans un tampon de lyse SKP supplémenté avec du  $\beta$ -mercaptoéthanol à 143mM (kit RNA/DNA Purification Micro Kit de Norgen Biotek Corporation). Les cellules restantes ont été mises : 1) en culture avec des billes anti-CD3/CD28 durant 18h (0,2 $\mu$ L billes/50 000 cellules dans 200 $\mu$ L de volume final) avant d'être lysées par le tampon SKP ou 2) en co-culture avec les LB naïfs (ratio 1:1,  $1 \times 10^4$  LT et  $1 \times 10^4$  LB naïfs/puits) en présence de SEB. Après 2 jours, les LT CD4 et LB co-cultivés sont marqués avec les anticorps anti-CD19 ECD, anti-CD4 PB et le marqueur de viabilité Zombie Aqua™ et triés afin de séparer les populations de LT CD4 des LB, les populations de LT CD4 sont ensuite lysées avec le tampon SKP. En parallèle, des co-cultures classiques sur 12 jours sont réalisées pour valider l'expérience. L'ARN et l'ADN de l'ensemble des échantillons sont ensuite extraits à l'aide du kit RNA/DNA Purification Micro Kit de Norgen Biotek Corporation en suivant le protocole établi par le fournisseur. Les échantillons ARN ont ensuite été envoyés à la plateforme GeT de Toulouse où le dosage et la vérification de la qualité des ARN ont été effectués ainsi que l'hybridation sur les puces à ARN (Human Clariom S assays, Thermo Fisher Scientific).

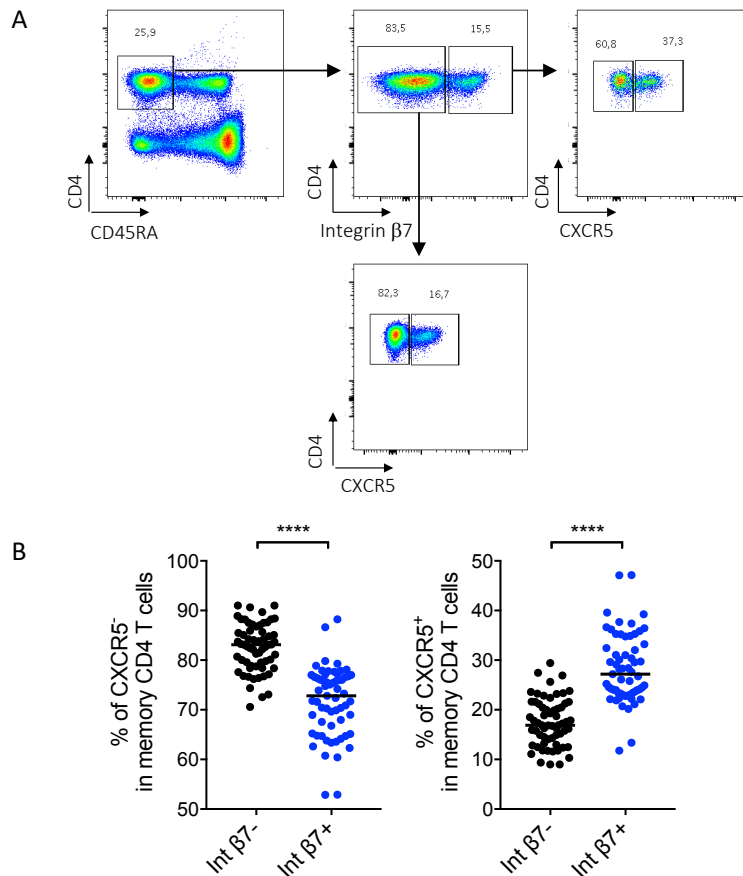
## Analyse statistique

Les tests statistiques et les représentations graphiques sont réalisés avec le logiciel GraphPad Prism. La différence entre différents groupes a été analysée par le test kruskal-Wallis (ANOVA unidirectionnelle sur rangs) ou le test de Sidak (ANOVA bidirectionnelle) apparié ou non apparié. La différence entre deux groupes a été analysée par un test t bilatéral de Student apparié ou non apparié. Un test de Wilcoxon a été réalisé lorsque la répartition des données ne suivait pas une distribution gaussienne. Une p-value inférieure à 0,05 est considérée comme significative.

## Résultats

**La proportion de Th (CXCR5-) et de TFh (CXCR5+) parmi les LT CD4 mémoires est différente dans le compartiment exprimant l'intégrine  $\beta 7$ , comparé aux LT CD4 mémoires int $\beta 7$ -.**

Les DC intestinales vont induire une forte expression de l'intégrine  $\beta 7$  au niveau des mLN et des PP. Les LT vont ensuite sortir des GALTs et entrer dans la circulation sanguine, puis vont revenir au niveau de sites effecteurs de l'intestin. Les lymphocytes dérivant de l'intestin sont donc identifiables, dans le sang, par leur expression de l'intégrine  $\beta 7$ . Nous avons donc identifié les LT CD4 mémoires circulants provenant de l'intestin (CD4+, CD45RA-, intégrine  $\beta 7$ +) par cytométrie en flux à partir de PBMC isolés de sujet sain, et comparé leurs propriétés à celles des LT CD4 mémoires n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$  (**Figure 26A**). Dans le compartiment int $\beta 7$ - et int $\beta 7$ +, les Th (CXCR5-) et les TFh (CXCR5+) ont été identifiés. Chez les sujets sains, la proportion de TFh était plus importante parmi les LT CD4 mémoires exprimant l'intégrine  $\beta 7$  que parmi les LT CD4 mémoires n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$  (médiane  $27,2 \pm 7\%$  vs  $16,9 \pm 4,8\%$  respectivement). A l'inverse, la proportion de LT CD4 CXCR5- était plus importante au sein du compartiment  $\beta 7$ - ( $83,1 \pm 4,8\%$  des LT CD4 n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$  et  $72,8 \pm 7\%$  des LT CD4 mémoires exprimant l'intégrine  $\beta 7$ ) (**Figure 26B**).



**Figure 26: La proportion de TFh circulants est plus importante au sein des LT CD4 mémoires exprimant l'intégrine  $\beta 7$  que dans le compartiment des LT CD4 mémoires n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$ .**

**A.** Stratégie de « gating » des TFh (CXCR5+) parmi les LT CD4 mémoires exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$ .  
**B.** Pourcentage de lymphocytes CXCR5- (à gauche) et de CXCR5+ (à droite) dans les LT CD4 mémoires int $\beta 7^-$  et int $\beta 7^+$ . T-test de Student apparié, moyenne  $\pm$  écart-type, \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

**Les lymphocytes Th dérivant de l'intestin (intégrine  $\beta 7^+$ ) ont un profil plus inflammatoire comparés aux Th n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$ .**

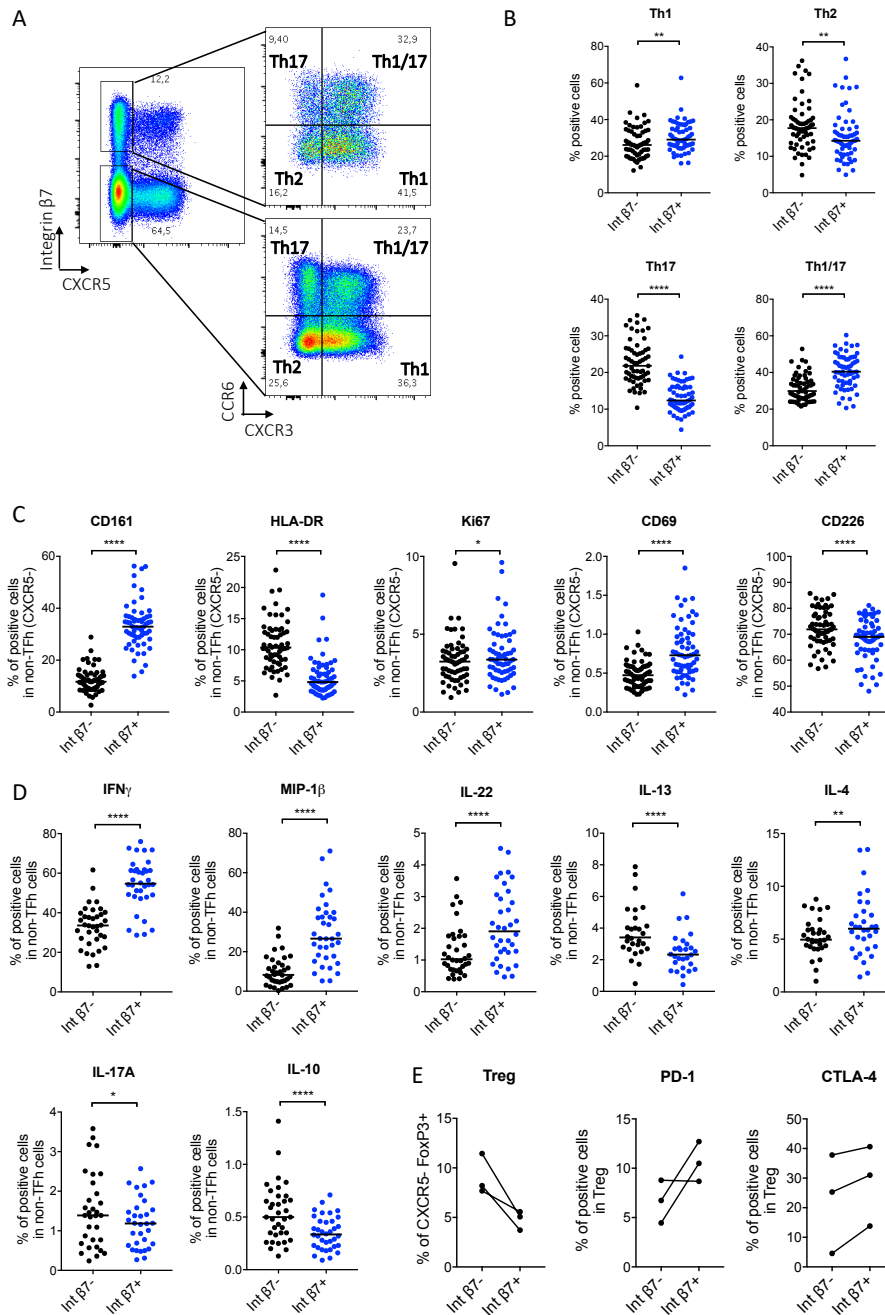
Parmi les LT CD4 CXCR5-, l'expression des récepteurs aux chimiokines CXCR3 et CCR6 permet de caractériser les Th1 (CXCR3+CCR6-), les Th2 (CXCR3-CCR6-), les Th17 (CXCR3-CCR6+) et les Th1/17 (CXCR3+CCR6+) (**Figure 27A**). Nous avons observé une répartition différente des sous-populations entre les LT CD4 int $\beta 7^+$  et int $\beta 7^-$ , avec une proportion plus importante de LT Th1/17 (Th1/17: médiane  $40,4 \pm 9,1\%$  vs médiane  $29,9 \pm 7,1\%$ ) et moins importante de Th17 (Th17: médiane  $12,4 \pm 3,9\%$  vs médiane  $21,8 \pm 5,8\%$ ) dans le compartiment  $\beta 7^+$  comparé au compartiment  $\beta 7^-$  (**Figure 27B**). En revanche, le pourcentage de Th17 circulants dérivant de l'intestin est inférieur à celui des Th17 non intestinaux.

La proportion de LT CD4 exprimant les molécules CD161, marqueurs des Th17 mémoires et des Th1 dérivant des Th17, CD69, marqueur d'activation précoce, était supérieure dans le compartiment intβ7+ comparé aux LT CD4 intβ7- (**Figure 27C**). Nous avons pu observer également une diminution de HLA-DR, isotype du CMH de classe II et marqueur d'activation, dans le compartiment intβ7+. De plus, nous avons constaté une légère augmentation de Ki67, marqueur de prolifération, dans le compartiment intβ7+ et, inversement, une légère diminution de CD226, facilitant la différenciation et la prolifération des LT, comparé aux LT CD4 intβ7- (CXCR5-). Afin de déterminer le profil cytokinique des LT CD4 dérivant de l'intestin, les PBMCs de donneurs sains ont été stimulées polyclonalement par de la PMA/ionomycine et l'expression des cytokines a été évaluée par cytométrie en flux. Nous avons observé qu'une proportion plus importante de LT CD4 intβ7+ exprimait l'IFN $\gamma$ , MIP-1 $\beta$  et l'IL-22, associé à une plus faible expression d'IL-10 comparés aux LT CD4 intβ7- (**Figure 27D**). Concernant les cytokines de type Th2, nous avons observé que la capacité d'expression de l'IL-4 des LT CD4 intβ7+ était légèrement augmentée tandis que celle de l'IL-13 était diminuée par rapport aux LT CD4 intβ7-.

Concernant les Treg (définis comme CD4+, CD45RA-, FOXP3+), nous avons observé que leur proportion ne différait pas significativement entre les LT CD4 intβ7- et intβ7+ (**Figure 27E**). Toutefois, nous avons constaté une plus faible proportion de Treg dans le compartiment β7+ sur les 3 donneurs étudiés (Treg intβ7-, médiane 8,2 ± 2% vs Treg intβ7+, médiane 5,1 ± 1%) suggérant qu'une augmentation du nombre de donneurs pourrait permettre de mettre en évidence une plus faible proportion de Treg parmi les LT CD4 β7+. L'étude de l'expression des molécules responsables de l'activité suppressive des Treg : PD-1 et CTLA-4 n'a pas montré de différence d'expression entre les Treg exprimant ou non l'intégrine β7.

L'ensemble de ces données indiquent que les LT CD4 intβ7+ (CXCR5-) présentent un profil d'activation et une capacité de sécrétion de cytokines différentes des LT CD4 intβ7-, avec un profil plus inflammatoire, potentiellement du fait de leur localisation initiale au niveau de l'intestin qui représente un micro-environnement plus inflammatoire.





**Figure 27: Les Th dérivant de l'intestin (intégrine  $\beta 7^+$ ) ont un profil plus inflammatoire comparés aux Th n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$ .**

**A.** Stratégie de « gating » des sous-populations de Th en fonction de l'expression de CCR6 et CXCR3 parmi les LT CD4 CXCR5- mémoires exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$ .

**B.** Pourcentage de Th1, Th2, Th17, Th1/17 parmi les LT CD4 CXCR5- intégrine  $\beta 7^-$  et intégrine  $\beta 7^+$ . T-test de Student apparié, \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

**C.** Pourcentage de cellules positives pour les marqueurs CD161, HLA-DR, Ki-67, CD69 et CD226 parmi les non-TFh (CD4+, CD45RA-, CXCR5-) exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$ . T-test de Student apparié, \* $p < 0.05$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

**D.** Pourcentage de non-TFh, intégrine  $\beta 7^-$  ou intégrine  $\beta 7^+$ , exprimant les cytokines  $IFN\gamma$ , IL-17A, IL-4 et IL-22, après une stimulation polyclonale (PMA/ionomycine). T-test de Student apparié, \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\*\* $p < 0.0001$ .

**E.** Pourcentage de Treg (CD4+, CD45RA-, CXCR5-, FoxP3+) parmi les LT CD4 mémoires exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$ . Pourcentage de Treg intégrine  $\beta 7^-$  ou intégrine  $\beta 7^+$  exprimant PD-1 ou CTLA-4, n=3.

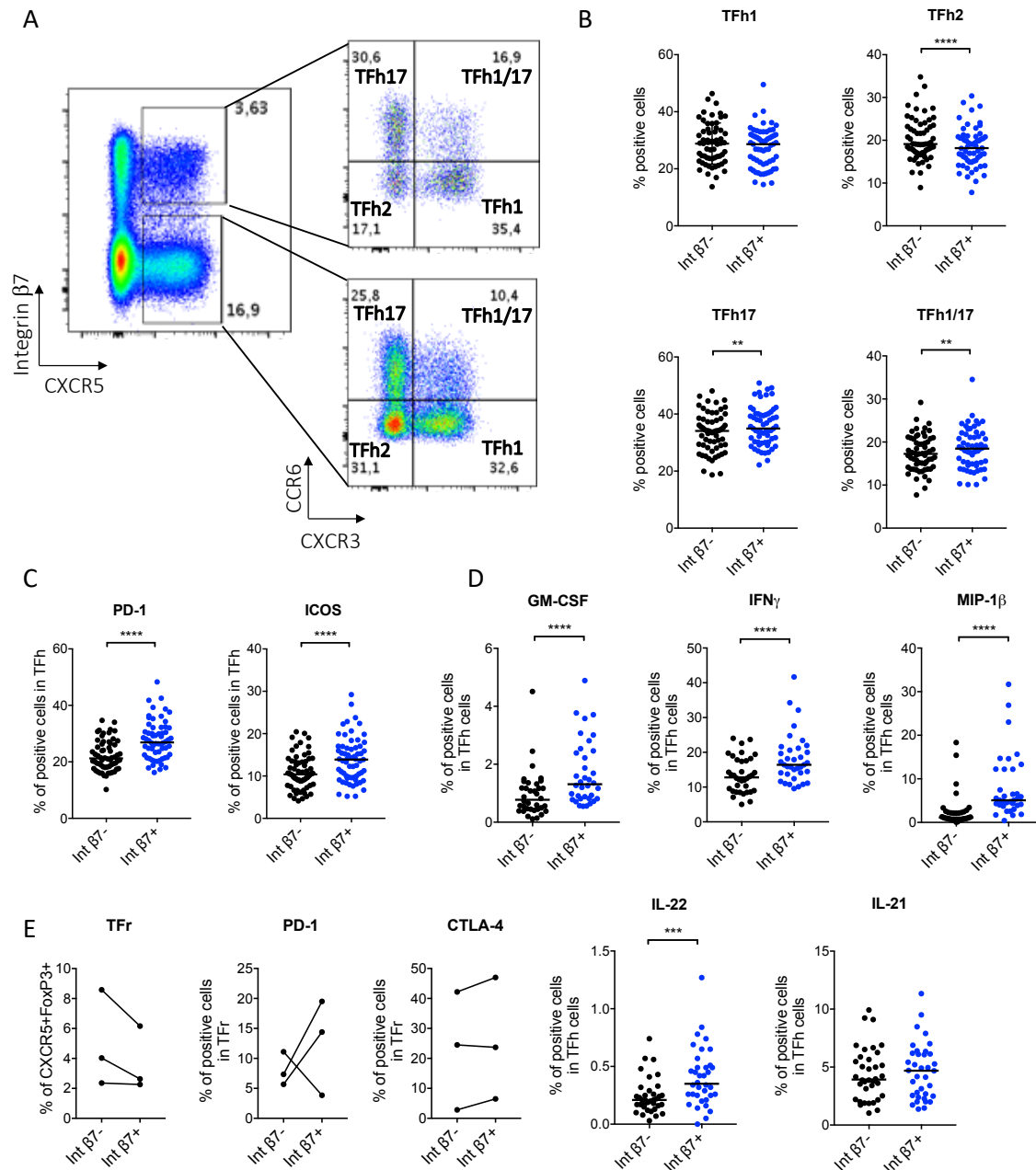
## Les TFh circulants dérivant de l'intestin présentent un profil plus activé comparés aux TFh circulant non intestinaux.

La proportion des TFh étant plus importante dans le compartiment int $\beta$ 7+ (**Figure 26B**), nous avons caractérisé ces cellules plus précisément. Tout d'abord, nous avons déterminé la proportion des différentes populations de TFh, les TFh ayant un phénotype capable d'aider les LB (TFh2 et TFh17), les TFh1 qui ne sont pas capables d'aider les LB naïfs et les TFh1/17 dont la fonction n'a pas été encore décrite. La répartition des sous-populations des TFh, parmi les TFh dérivant de l'intestin ou non, a été évaluée par cytométrie en flux en fonction de l'expression de CXCR3 et CCR6 (**Figure 28A**). Nous avons observé dans le compartiment int $\beta$ 7+, une légère augmentation de la proportion des TFh17 et des TFh1/17 par rapport au compartiment int $\beta$ 7- (TFh17 : 35 $\pm$  6,8% vs 34 $\pm$  6,9% ; TFh1/17 : médiane 18,5 $\pm$  4,6% vs 17,2 $\pm$  4,1%) (**Figure 28B**). La proportion des TFh2 est, quant à elle, diminuée parmi les TFh int $\beta$ 7+ comparés aux TFh int $\beta$ 7-, et celle des TFh1 est inchangée. Nous avons ensuite étudié l'expression de PD-1 et ICOS, molécules impliquées dans l'interaction entre les TFh et les LB et avons pu observer que ces molécules étaient exprimées par une plus grande proportion de TFh dérivant de l'intestin comparés aux TFh intégrine  $\beta$ 7- (**Figure 28C**).

La capacité des TFh à exprimer des cytokines pro-inflammatoires a été évaluée par cytométrie en flux, après une stimulation polyclonale (PMA/ionomycine). Il est à noter que le pourcentage de cellules positives pour les différentes cytokines était plus faible pour les TFh par rapport aux Th. Nous avons observé que les TFh dérivant de l'intestin (TFh int $\beta$ 7+) avaient une expression plus forte des cytokines pro-inflammatoires, IFN $\gamma$ , GM-CSF, IL-22 et MIP-1 $\beta$ , comparés aux TFh int $\beta$ 7- (**Figure 28D**). En revanche, le pourcentage de TFh IL-21+ n'était pas significativement différent entre les deux populations.

L'évaluation de la proportion des TFr (CD4+, CD45RA-, CXCR5+, FOXP3+) parmi les TFh int $\beta$ 7+ et int $\beta$ 7- n'a pas permis de mettre en évidence de différence entre la proportion de TFr dans le compartiment int $\beta$ 7+ et le compartiment int $\beta$ 7- (**Figure 28E**). De même, l'expression des molécules inhibitrices CTLA-4 et PD-1 était similaire entre les TFr int $\beta$ 7+ et int $\beta$ 7-.

De façon similaire aux Th, les TFh exprimant l'intégrine  $\beta$ 7 possèdent un profil différent des TFh circulants qui ne sont pas d'origine intestinale. En effet, nous avons observé que la proportion de TFh était plus élevée parmi les LT CD4 int $\beta$ 7+ que parmi LT CD4 int $\beta$ 7-. Les LT CD4 int $\beta$ 7+ présentaient également un état plus activé ainsi qu'une capacité de sécrétion de cytokines pro-inflammatoires plus élevée que les TFh ne dérivant pas de l'intestin. En outre, dans la circulation, la proportion de TFh ayant un phénotype capable d'aider les LB naïfs était légèrement supérieure dans le compartiment  $\beta$ 7+.



**Figure 28: Les TFh circulants dérivant de l'intestin présentent un profil plus activé comparés aux TFh circulant non intestinaux.**

**A.** Stratégie de « gating » des différentes sous-populations de TFh (CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>, CXCR5<sup>+</sup>) en fonction de l'expression de l'intégrine β7 et de l'expression de CXCR3 et CCR6.

**B.** Pourcentage de TFh1, TFh2, TFh17, TFh1/17 parmi les LT CD4 mémoires exprimant ou non l'intégrine β7. T-test de Student apparié, moyenne ± écart-type, \*\*p<0.01, \*\*\*\* p<0.0001.

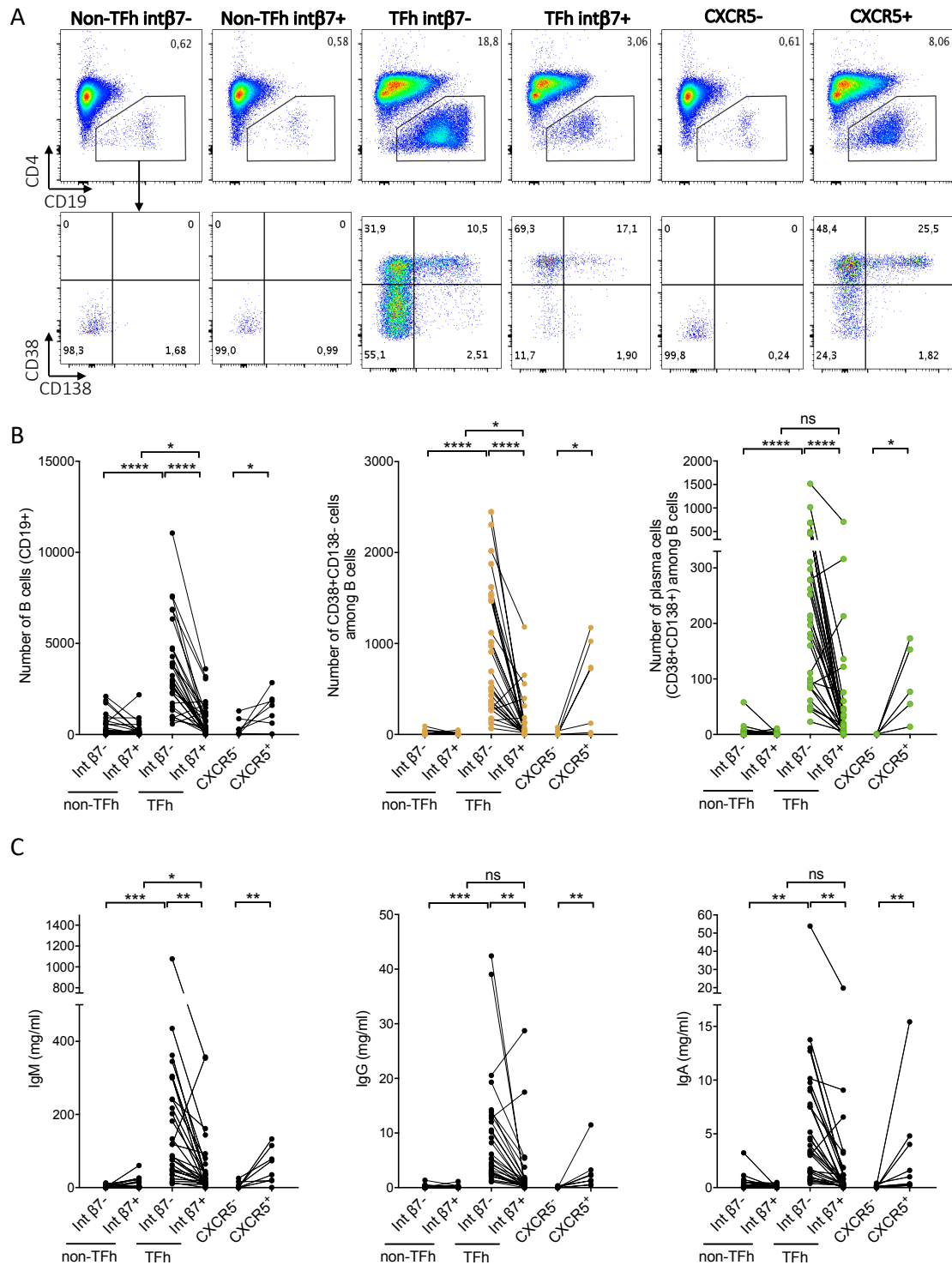
**C.** Pourcentage de cellules positives pour les marqueurs PD-1 et ICOS parmi les TFh (CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>, CXCR5<sup>+</sup>) exprimant ou non l'intégrine β7. T-test de Student apparié, \*\*\*\* p<0.0001.

**D.** Pourcentage de TFh, intégrine β7<sup>-</sup> ou intégrine β7<sup>+</sup>, exprimant les cytokines IFN $\gamma$ , GM-CSF, MIP-1 $\beta$ , IL-22 et IL-21, après une stimulation polyclonale (PMA/ionomycine). T-test de Student apparié, \*\*p<0.01, \*\*\*\* p<0.0001.

**E.** Pourcentage de TFr (CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>, CXCR5<sup>+</sup>, FoxP3<sup>+</sup>) parmi les TFh (CXCR5<sup>+</sup>) exprimant ou non l'intégrine β7. Pourcentage de TFr intégrine β7<sup>-</sup> ou intégrine β7<sup>+</sup> exprimant PD-1 ou CTLA-4, n=3.

### Les TFh circulants exprimant l'intégrine $\beta 7$ ont une faible capacité d'aide aux LB naïfs.

Comme nous avons observé un profil différent des TFh int $\beta 7^+$ , nous nous sommes demandé s'il y avait une modification de leur fonction. Pour déterminer leur capacité à aider les LB, les TFh mémoires (CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>, CXCR5<sup>+</sup>) int $\beta 7^+$  et int $\beta 7^-$  ont été triés, et cultivés avec des LB naïfs autologues (CD19<sup>+</sup>CD27-IgD<sup>+</sup>). Les non-TFh (CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>-</sup>, CXCR5<sup>-</sup>) exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  ainsi que les CXCR5<sup>-</sup> et CXCR5<sup>+</sup> totaux ont été également triés pour comparaison. Afin d'imiter l'interaction spécifique de l'antigène entre les TFh et les LB, l'entérotoxine B staphylococcique (SEB), un super antigène, a été ajoutée aux cultures. Après 12 jours de co-culture, les surnageants ont été récoltés, et la différenciation des LB (CD4-CD19<sup>+</sup>) en plasmablastes (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>-</sup>) et en plasmocytes (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) a été analysée par cytométrie en flux (**Figure 29A**). En accord avec la littérature, les CXCR5<sup>+</sup> totaux induisaient la différenciation des LB naïfs en plasmocytes ainsi que la sécrétion d'IgM, d'IgG et d'IgA contrairement aux CXCR5<sup>-</sup> totaux (**Figure 29B et 29C**). De façon intéressante, nous avons constaté que les TFh dérivant de l'intestin induisaient une différenciation bien plus faible des LB naïfs en plasmocytes comparativement aux TFh int $\beta 7^-$  (**Figure 29B**). De plus, la production d'IgM, IgG et IgA par les LB différenciés étaient minime dans les co-cultures avec les TFh int $\beta 7^+$  comparés aux TFh int $\beta 7^-$  (**Figure 29C**). Concernant les populations non-TFh  $\beta 7^-$  et  $\beta 7^+$ , celles-ci n'étaient pas capable d'induire la différenciation des LB naïfs, ni la sécrétion d'IgG et d'IgA (**Figure 29C**).



**Figure 29: Les TFh circulants exprimant l'intégrine  $\beta 7$  ont une faible capacité d'aide aux LB naïfs.**

**A.** Stratégie de « gating » des LB, des plasmablastes (CD38+, CD138-), et des plasmocytes (CD38+CD138), après une co-culture de 12 jours entre des LB naïfs (CD27-IgD+) et les différentes populations de LT CD4, en présence de SEB (1 $\mu$ g/ml). Les co-cultures ont été réalisées avec un ratio 1:1(10 000 LT CD4 et 10 000 LB naïfs par puits).

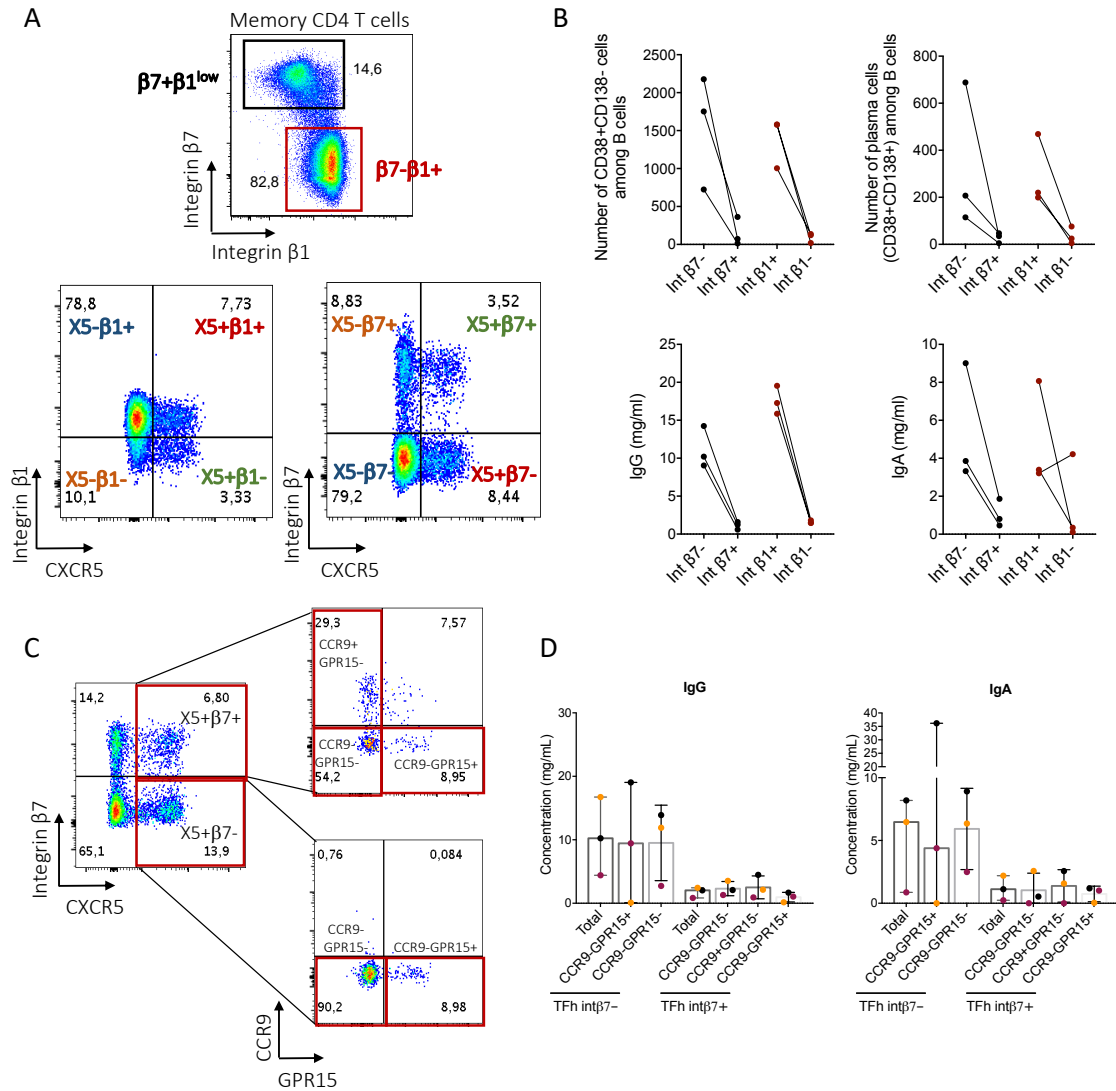
**B.** Nombre absolu de LB, plasmablastes et plasmocytes par puits de culture à jour 12. One-way ANOVA (Test de Tukey), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

**C.** Concentration d'IgM, IgG et IgA (mg/ml) dans les surnageants de co-cultures à 12 jours. One-way ANOVA (Test de Tukey), \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$ , \*\*\*\*  $p < 0.0001$ .

Pour confirmer ces observations, nous avons voulu savoir si l'utilisation de l'anticorps anti-intégrine  $\beta 7$  lors du tri cellulaire pouvait introduire un biais dans le déroulement de la co-culture, par exemple en activant les TFh  $\beta 7^+$  ou en gênant l'interaction entre les TFh int $\beta 7^+$  et les LB naïfs. Nous avons constaté que les LT CD4 mémoires int $\beta 7^+$  exprimaient également l'intégrine  $\beta 1$  à un faible niveau (**Figure 30A**), alors que les LT CD4 mémoires n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$  exprimaient l'intégrine  $\beta 1$  de façon plus importante. La différence d'expression de ces deux intégrines permet donc de séparer les LT CD4 int $\beta 7^+$  int $\beta 1^{\text{low}}$  et int $\beta 7^-$  int $\beta 1^+$  en fonction de leur expression d'intégrine  $\beta 1$  ou d'intégrine  $\beta 7$ . Nous avons réalisé une co-culture entre des LB naïfs et les différentes populations de LT CD4 triées en utilisant l'anticorps anti-intégrine  $\beta 7$  ou l'anticorps anti-intégrine  $\beta 1$  pour séparer ces deux populations. A l'image des TFh int $\beta 7^+$ , les TFh int $\beta 1^-$  induisaient une plus faible différenciation des LB naïfs en plasmablastes et plasmocytes, associée à une plus faible production d'IgG et IgA comparés aux TFh int $\beta 1^+$  (**Figure 30B**). Les TFh int $\beta 7^-$  et les TFh int $\beta 1^+$  avaient une capacité de différenciation des LB naïfs qui était plus importante que celle des TFh int $\beta 7^+$  et des TFh int $\beta 1^-$ . Ces résultats indiquent donc que l'utilisation des anticorps anti-int $\beta 1$  ou int $\beta 7$  lors du tri cellulaire n'impacte pas le déroulement de la co-culture et confirment que les TFh int $\beta 1^{\text{low}}\beta 7^+$  ont une capacité d'aide aux LB naïfs minime comparés aux TFh int $\beta 1^+\beta 7$ .

Nous avons ensuite voulu savoir si la faible capacité d'aide aux LB observée avec les TFh int $\beta 7^+$  était également retrouvée chez les TFh intestinaux identifiés par d'autres marqueurs. En effet, l'intégrine  $\beta 7^+$  est un marqueur d'adressage de l'intestin grêle et du colon, tandis que CCR9 est un marqueur de d'adressage de l'intestin grêle uniquement, et GPR15 est un marqueur d'adressage pour le colon mais aussi pour la peau. Nous avons donc réalisé des co-cultures entre les LB naïfs et les TFh exprimant CCR9 et GPR15 (**Figure 30C**). Parmi les TFh int $\beta 7^+$  totaux, les TFh int $\beta 7^+$ CCR9+GPR15-, les TFh int $\beta 7^+$ CCR9-GPR15+ et les TFh int $\beta 7^+$ CCR9-GPR15- ont été triés par cytométrie en flux. Les TFh int $\beta 7^-$  totaux et les TFh int $\beta 7^-$ CCR9-GPR15+ ont été utilisés pour comparaison. L'expression du marqueur CCR9 est restreint au compartiment exprimant l'intégrine  $\beta 7^+$ , contrairement à l'expression du marqueur GPR15 présent également dans le compartiment int $\beta 7^-$  (**Figure 30C**). Après 12 jours de co-culture, nous avons pu constater que les différentes populations de TFh int $\beta 7^+$  induisaient toutes une sécrétion d'IgG et IgA inférieure aux populations de TFh int $\beta 7^-$ , suggérant que les TFh exprimant l'intégrine  $\beta 7$  présentent un défaut d'aide aux LB *in vitro* indépendamment de la coexpression de CCR9 et/ou GPR15 (**Figure 30D**). Il est à noter qu'au sein des TFh int $\beta 7^-$ , il existait une variabilité concernant les populations capables d'aider le plus les LB naïfs avec, dans 2 cas sur 3, une sécrétion d'IgG et d'IgA supérieure avec les TFh int $\beta 7^-$ CCR9-GPR15+.

L'ensemble de ces observations montre que, malgré leur phénotype activé, les TFh circulants exprimant l'intégrine  $\beta 7$  ont une capacité minimale, comparés aux TFh circulants int $\beta 7^-$ , à induire la différenciation des LB naïfs en plasmocytes ainsi que la sécrétion d'Ig.



**Figure 30: Les TFh circulants exprimant l'intégrine  $\beta 7$  et CCR9 ont une plus faible capacité d'aide aux LB naïfs.**

**A.** En haut, expression différentielle de l'intégrine  $\beta 7$  et de l'intégrine  $\beta 1$  par les LT CD4 mémoires. En bas, la stratégie utilisée pour le tri cellulaire par cytométrie en flux des populations de non-TFh et TFh en fonction de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  ou l'intégrine  $\beta 7$ .

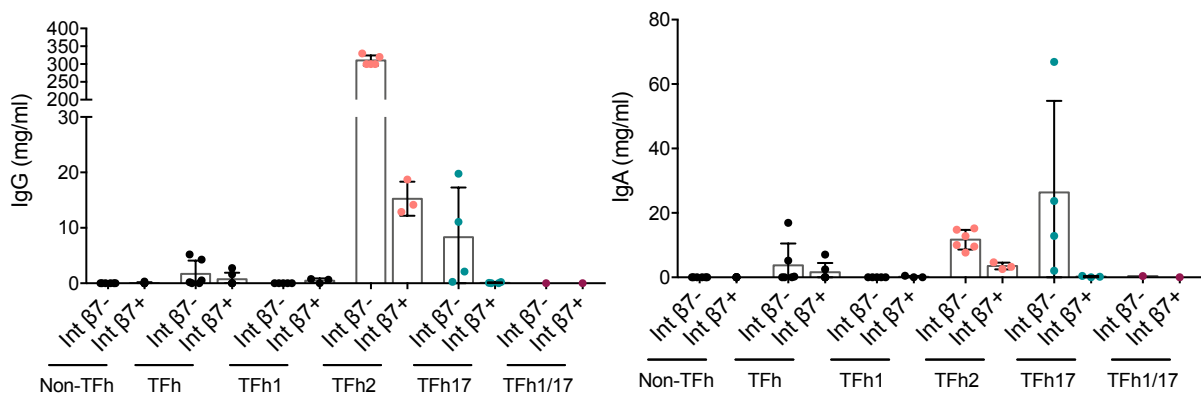
**B.** Nombres absolus de LB, plasmablastes et plasmocytes (en haut) et concentrations d'IgG et IgA (en bas) des co-cultures à 12 jours entre des LB naïfs et les populations triées (ratio 1 :1, en présence de SEB), n=3.

**C.** Stratégie de « gating » des LT CD4 mémoires, pour le tri par cytométrie en flux, des différentes populations intestinales en fonction de l'expression des marqueurs d'adressage intestinaux : CCR9, intégrine  $\beta 7$  et GPR15. A l'intérieur des TFh exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$ , les populations exprimant ou non CCR9 et/ou GPR15 sont triées (carrés rouges) et mises en culture avec des LB naïfs en présence de SEB. Les TFh int  $\beta 7^+$  et les TFh int  $\beta 7^-$  sont utilisés comme contrôles.

**D.** Concentrations d'IgG et IgA dosées dans les surnageants de co-cultures des LB naïfs et des populations indiquées à jour 12, moyenne  $\pm$  écart-type, n=3.

### Les cTFh2 et les cTFh17 exprimant l'intégrine $\beta 7$ ont une faible capacité d'aide aux LB naïfs.

Les sous-populations des TFh (TFh1, TFh2, TFh17 et TFh1/17) ont une capacité différente d'aide aux LB naïfs. Pour déterminer si la faible capacité d'aide aux LB naïfs des TFh int $\beta 7^+$  venait d'une sous-population de TFh particulière, nous avons étudié la fonction, *in vitro*, de chaque sous-population de TFh parmi les TFh int $\beta 7^+$  et les TFh int $\beta 7^-$ , en culture avec des LB naïfs durant 12 jours. Parmi les TFh int $\beta 7^-$ , les TFh2 (CD4+, CD45RA-, CXCR5+, CCR6-, CXCR3-) et les TFh17 (CD4+, CD45RA-, CXCR5+, CCR6+, CXCR3-) étaient capables d'induire la sécrétion d'IgG et d'IgA par les LB naïfs (**Figure 31**). Les TFh2 et TFh17 exprimant l'intégrine  $\beta 7$  induisaient une plus faible sécrétion d'IgG et d'IgA comparés aux TFh2 et TFh17 int $\beta 7^-$ . En accord avec les données de la littérature, les TFh1 int  $\beta 7^-$  mais aussi les TFh1 int $\beta 7^+$  n'étaient pas capables d'induire la sécrétion d'IgG et A. Il est à noter que, dans certaines expériences, nous avons observé que les TFh1/17 int $\beta 7^-$ , encore peu décrits, étaient capables d'induire la différenciation des LB naïfs. La capacité d'aide de cette population nécessiterait donc davantage d'investigations. Ces observations ont montré que la faible capacité d'aide aux LB des TFh int  $\beta 7^+$  n'était pas restreinte à une sous-population de TFh.



**Figure 31 : Les cTFh2 et les cTFh17 exprimant l'intégrine  $\beta 7$  ont une faible capacité d'aide aux LB naïfs.**

Concentrations d'IgG et d'IgA dosées dans les surnageants récoltés après 12 jours de co-culture entre les LB naïfs et les différentes sous populations de TFh, exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  (ratio 1 :1, SEB). Résultat représentatif (avec réplicats) de 3 expériences.

### La faible capacité d'aide aux LB des TFh int $\beta 7^+$ n'est pas due à une expression différentielle d'ICOS, CD40L, OX40 ou PD-1.

Pour comprendre les raisons de la faible capacité d'aide des TFh int $\beta 7^+$ , nous avons réalisé une cinétique de co-culture entre les TFh, provenant de l'intestin ou non, avec des LB naïfs. Du 1<sup>er</sup> au 12<sup>ème</sup> jour, l'expression des molécules impliquées dans l'interaction entre TFh et LB a été évaluée par cytométrie en flux. Nous avons observé que le nombre de LT CD4 dans les co-cultures avec les TFh était similaire

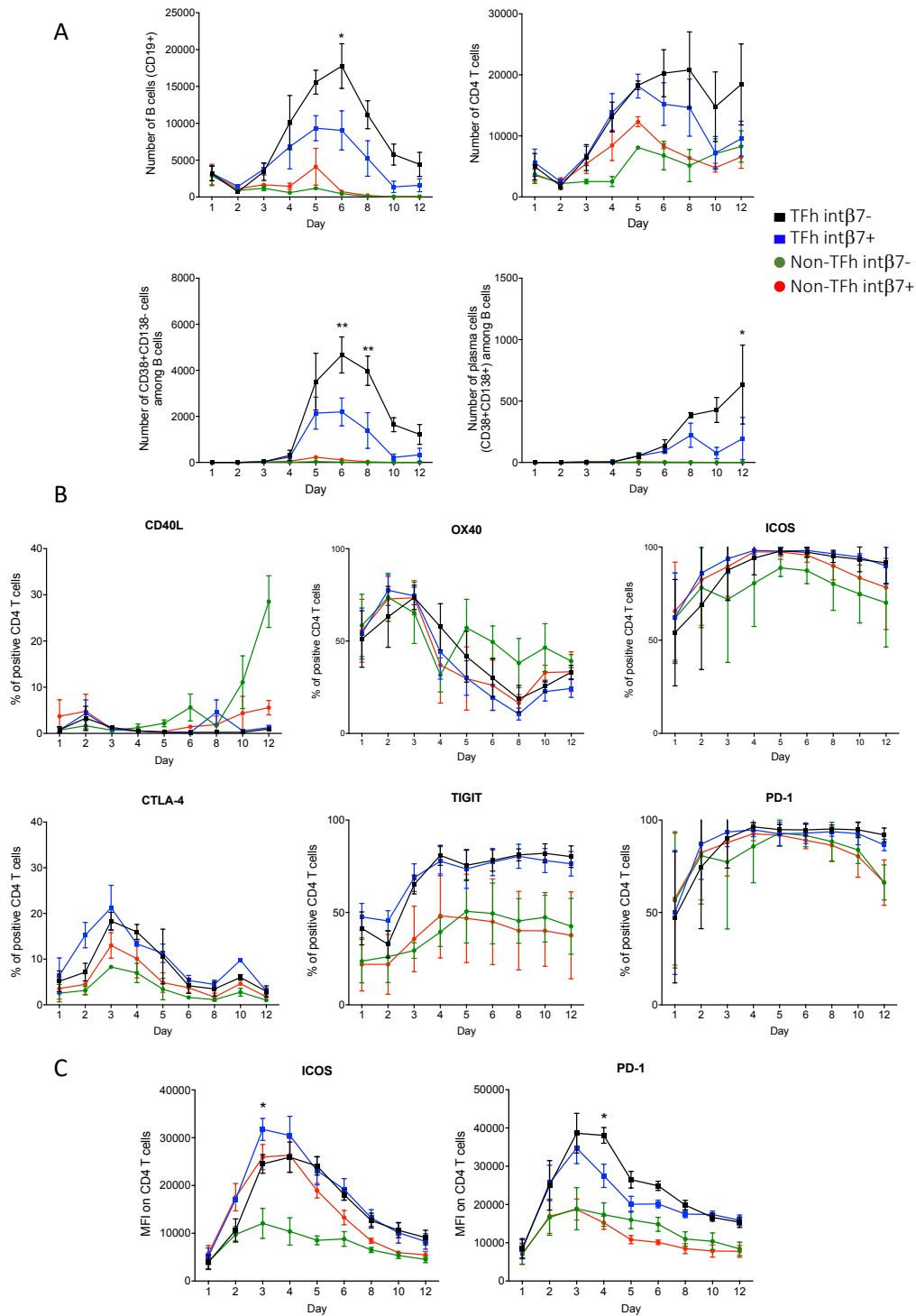


entre le compartiment int $\beta$ 7<sup>+</sup> et int $\beta$ 7<sup>-</sup> jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour de culture (**Figure 32A**). A partir de jour 5, le nombre de LT CD4 diminuait pour les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> mais se maintenait pour les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour. Toutefois, le nombre de LT CD4 dans les co-cultures avec les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> et int $\beta$ 7<sup>-</sup> n'était pas significativement différent. En outre, nous avons pu constater que les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> prolifèrent davantage par rapport aux non-TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup>, en présence de LB naïfs. De plus, à partir du 2<sup>ème</sup> jour, à la fois les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> induisaient la prolifération des LB naïfs, contrairement aux non-TFh. Les plasmablastes (CD19+CD38+CD138<sup>-</sup>) et plasmocytes (CD19+CD38+CD138<sup>+</sup>) apparaissaient à partir du 4<sup>ème</sup> jour et 5<sup>ème</sup> jour, respectivement, dans les co-cultures contenant les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et int $\beta$ 7<sup>+</sup>. La génération des plasmocytes (CD19+CD38+CD138<sup>+</sup>) avec les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et int $\beta$ 7<sup>+</sup> coïncide avec la diminution du nombre de LB et de plasmablastes dans les cultures. Cependant, en accord avec les résultats précédents, la sécrétion d'Ig, l'amplitude de la différenciation des LB en plasmablastes et plasmocytes observés étaient plus faibles avec les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup>.

Nous n'avons pas observé de différence dans le pourcentage de TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> exprimant les molécules impliquées dans l'interaction LT:LB : CD40-L, OX40 et ICOS. Le pourcentage de cellules exprimant TIGIT ainsi que les molécules inhibitrices, PD-1 et CTLA-4, était également inchangée entre les deux populations de TFh (**Figure 32B**). Toutefois, la moyenne d'intensité de fluorescence (MFI) d'ICOS était transitoirement supérieure pour les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> comparés aux TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> au 3<sup>ème</sup> jour de culture (**Figure 32C**). La MFI de PD-1 était, quant à elle, supérieure pour les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> au 4<sup>ème</sup> jour, comparés aux TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup>. La MFI de CD40-L, OX40, TIGIT et CTLA-4 n'était pas différente entre les deux populations de TFh (non montré). Nous n'avons pas observé de différence dans le pourcentage de cellules exprimant ICOS, OX40, CTLA-4 et PD-1 entre les non-TFh et les TFh. En revanche, nous avons observé une différence dans la MFI d'ICOS et PD-1 entre les TFh et les non-TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>, ainsi qu'entre les TFh et les non-TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> pour PD-1 uniquement. L'expression des molécules impliquées dans l'interaction LT :LB est donc globalement similaire entre les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> et les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>, et ne permet donc pas d'expliquer la faible capacité d'aide aux LB des TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup>. L'ensemble de ces observations indique que les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> ne présentent pas un défaut d'expression de molécules favorisant l'interaction entre les LB et TFh (ICOS, CD40L, TIGIT et OX40), ni une surexpression de molécules régulatrices de cette interaction, CTLA-4 et PD-1. L'ensemble de ces résultats a montré que les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> étaient capables d'aider les LB naïfs à se différencier en plasmablastes et plasmocytes mais que cette aide est beaucoup plus limitée qu'avec les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>.

Nous avons ensuite voulu déterminer si la sécrétion d'IL-21, cytokine essentielle dans la fonction des TFh était différente entre les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> et int $\beta$ 7<sup>-</sup>. Les non-TFh et TFh exprimant ou non l'intégrine  $\beta$ 7 ont tout d'abord été stimulés par des billes coâtées avec des anticorps anti-CD3 et anti-CD28 pour mimer

le signal 1 et 2 d'activation (**Figure 33A**). Avec des billes anti-CD3/CD28, la sécrétion d'IL-21 entre les non-TFh et les TFh n'était pas différente. Pour évaluer la sécrétion d'IL-21 dans le contexte d'une interaction plus physiologique TFh : LB, nous avons dosé l'IL-21 dans les surnageants de co-cultures de TFh et de LB naïfs après 2 jours (**Figure 33B**). La sécrétion d'IL-21 était supérieure dans les surnageants de co-culture contenant les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> que dans ceux contenant non-TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> ( $p=0,0625$ ). Toutefois, nous n'avons pas pu observer de différence de sécrétion d'IL-21 entre les co-cultures réalisées avec les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et celles réalisées avec les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup>. Il est à noter que les non-TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> en co-culture avec des LB naïfs ont tendance à sécréter plus d'IL-21 que les non-TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> (non significatif). Au vu de l'absence de différence de sécrétion d'IL-21 entre les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> et des TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> dans les surnageants récoltés après 2 jours de co-culture, nous avons dosé l'IL-21 dans les surnageants de cinétique de co-culture (du 1<sup>er</sup> au 8<sup>ème</sup> jour) (**Figure 33C**). Dans ces surnageants, l'IL-21 a commencé à être détectée à partir du 2<sup>ème</sup> jour et a continué à augmenter jusqu'au 8<sup>ème</sup> jour. Nous n'avons pas observé de différence dans la sécrétion d'IL-21 entre les co-cultures avec les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> tout au long de la cinétique. Ces résultats indiquent que la faible capacité d'aide aux LB naïfs des TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> n'est pas due à une plus faible capacité de sécrétion d'IL-21 des TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> comparés aux TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>.

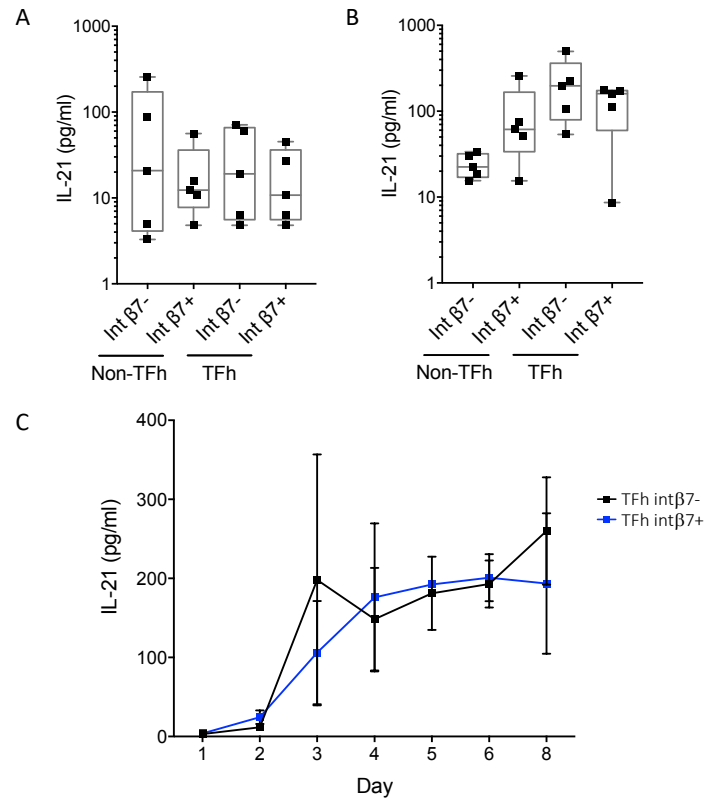


**Figure 32: La faible capacité d'aide aux LB des TFh intβ7+ comparativement aux TFh intβ7- n'est pas due à une expression différentielle d'ICOS, CD40L, OX40 ou PD-1.**

**A.** Cinétique des nombres absolus de LT CD4, LB, plasmablastes, et plasmocytes dans les co-cultures de LT CD4 triés (non-TFh et TFh exprimant ou non l'intégrine β7) avec des LB naïfs. Two-way ANOVA (multiple comparaison), moyenne ± SEM, \* p<0.05, \*\*p<0.01, n=4.

**B.** Cinétique d'expression d'ICOS, CD40-L, OX40, PD-1 et CTLA-4 par les sous populations de LT CD4 cultivés avec les LB naïfs. Two-way ANOVA (multiple comparaison), moyenne ± SEM, \* p<0.05, n=4.

**C.** Cinétique de la MFI d'ICOS et PD-1 des TFh (intβ7- et intβ7+) et des non-TFh (intβ7- et intβ7+) cultivés avec les LB naïfs. Two-way ANOVA (multiple comparaison), moyenne ± SEM, \* p<0.05, n=4.



**Figure 33: La faible capacité d'aide aux LB des TFh intβ7+ comparativement aux TFh intβ7- n'est pas due à un défaut de sécrétion de l'IL-21.**

**A.** Concentration d'IL-21, mesurée par Luminex, dans les surnageants de culture des non-TFh et TFh exprimant ou non l'intégrine β7 stimulés avec des billes anti-CD3/CD28 durant 2 jours ( $5 \times 10^4$  cellules/puits). Moyenne  $\pm$  écart-type, n=5.

**B.** Concentration d'IL-21, mesurée par Luminex, dans les surnageants de co-cultures entre des LB naïfs et TFh intβ7+, TFh intβ7-, non-TFh intβ7- ou non-TFh intβ7+ (ratio 1 :1,  $5 \times 10^4$  LB et  $5 \times 10^4$  LT/puits) récoltés après 2 jours de culture. Moyenne  $\pm$  écart-type, n=5.

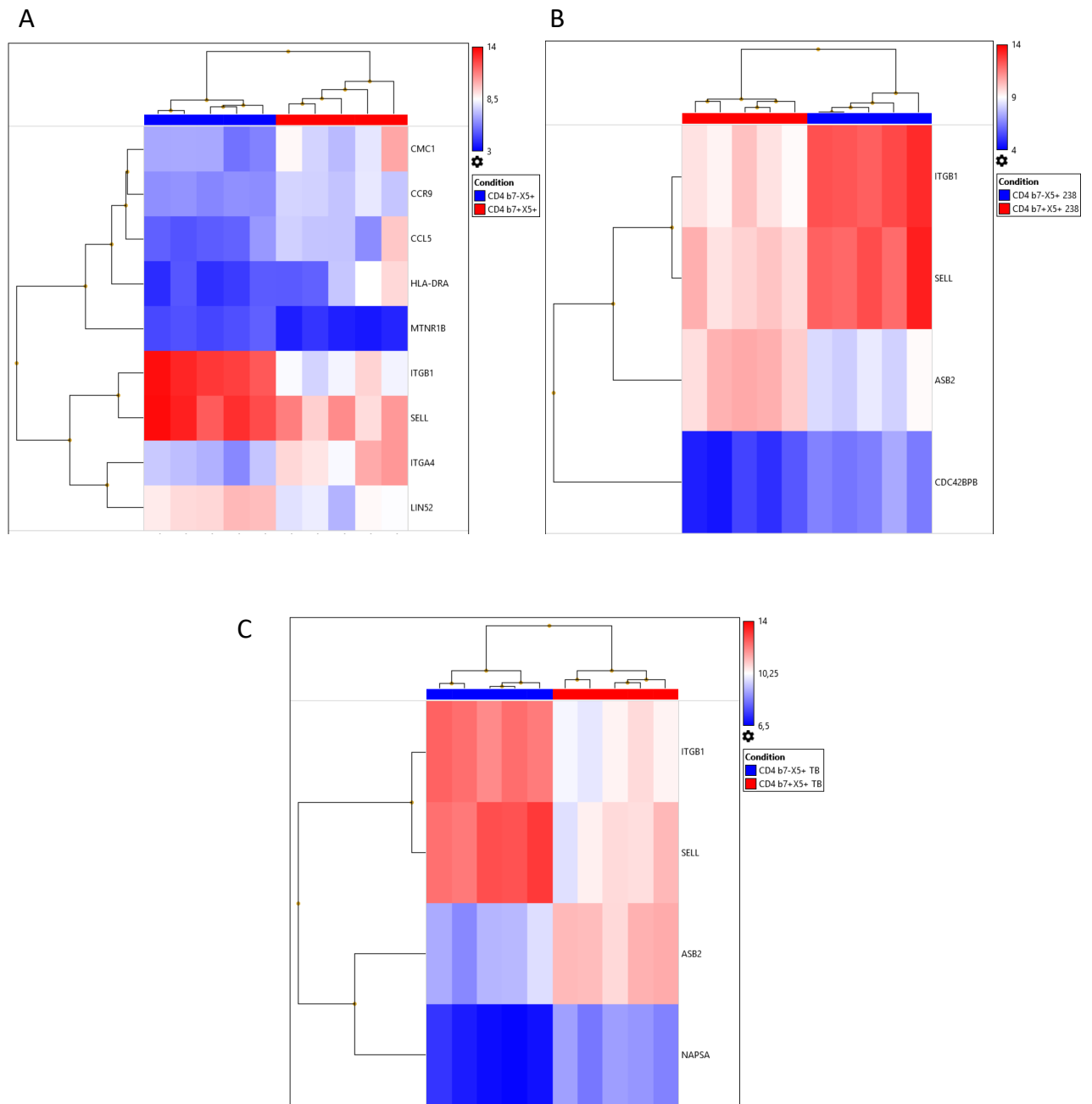
**C.** Cinétique de concentration d'IL-21, mesurée par Luminex, dans les surnageants de co-cultures entre des LB naïfs et des TFh intβ7- ou des TFh intβ7+ (ratio 1 :1,  $1 \times 10^4$  LB et  $1 \times 10^4$  LT/puits) de 1 à 8 jours. Moyenne  $\pm$  SEM, n=2.

### L'analyse transcriptomique des TFh intβ7- et intβ7+ révèle une forte homogénéité entre ces deux populations.

Nous nous sommes intéressés à l'expression des gènes des TFh intβ7- et TFh intβ7+ pour comprendre la différence de fonction observée. Le niveau d'expression des ARNm a été analysé par puce à ARN (Microarray), sur plus de 20 000 gènes codants différents de fonctions connues, directement après tri cellulaire (**Figure 34A**), après stimulation avec des billes anti-CD3/anti-CD28 durant 18h (**Figure 34B**) et après deux jours de co-culture avec des LB naïfs (**Figure 34C**), pour étudier l'impact de la stimulation sur les TFh intβ7- et intβ7+. L'analyse de l'expression différentielle des gènes entre les TFh intβ7- et intβ7+, effectuée sur 5 donneurs sains, a révélé un fort degré d'uniformité et de cohérence entre ces deux populations, toutes stimulations confondues. Toutefois, nous avons pu observer que le niveau

d'expression du gène codant pour la L-sélectine était diminué dans les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup>, dans les conditions non stimulés ( $p=0,0002$ ) ou stimulés (avec les billes CD3/CD28 et les LB naïfs,  $p<0,05$ ), comparés aux TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>. D'autre part, nous avons constaté qu'une fois stimulés (avec des billes ou des LB naïfs), les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> exprimaient plus fortement le gène ASB2 codant pour les protéines de la famille des ASB (ankyrin repeat and SOCS box-containing), impliquées notamment dans l'inhibition des protéines SOCS (suppressor of cytokine signalling). Les protéines SOCS sont impliquées, à leur tour, dans l'inhibition de la transduction du signal des cytokines.

L'analyse transcriptomique a montré une surprenante homologie dans l'expression des différents gènes étudiés entre les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et int $\beta$ 7<sup>+</sup>, ne permettant pas d'expliquer clairement la fonction limitée d'aide aux LB des TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> mais nécessite plus d'investigations quant au rôle des gènes retrouvés différemment exprimés dans la biologie des TFh.



**Figure 34: Analyse des puces à ARN à l'échelle du génome des TFh int $\beta$ 7- et int $\beta$ 7+.**

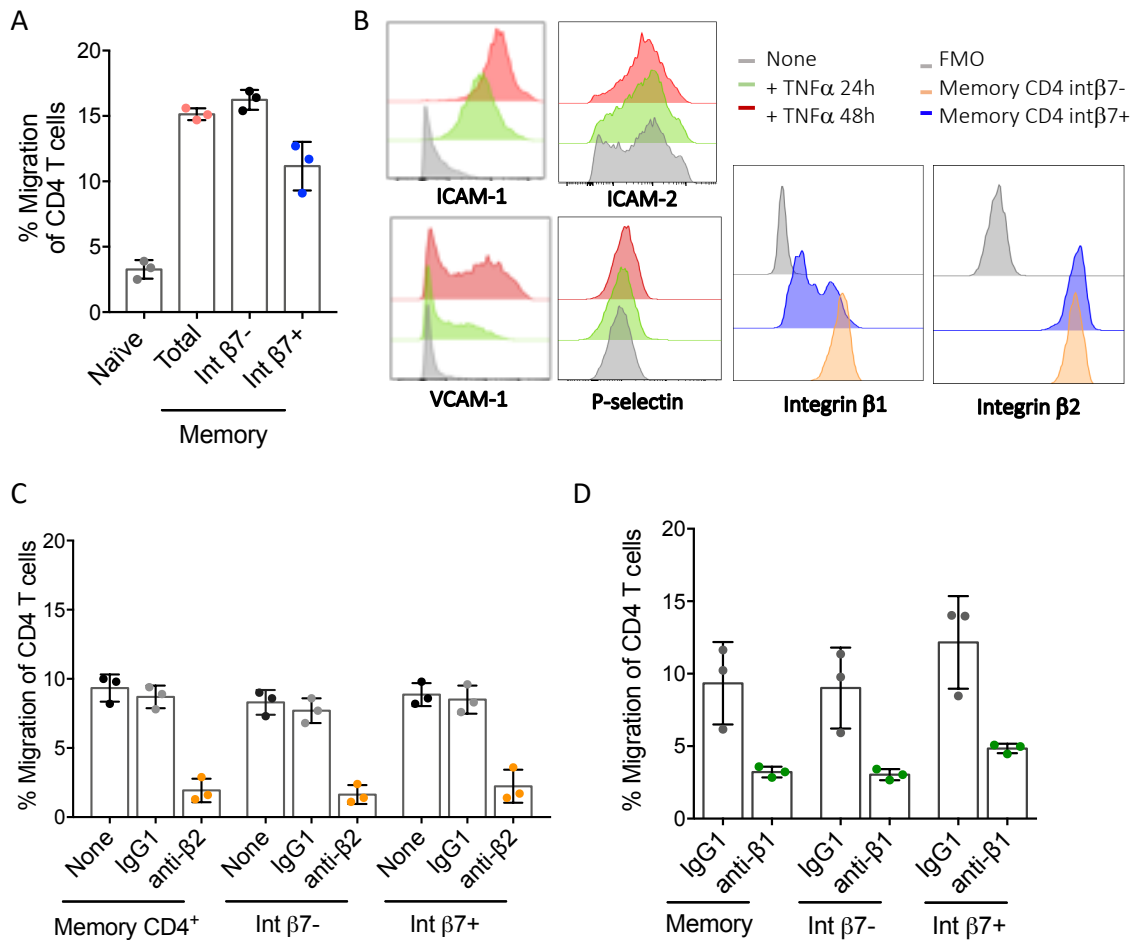
Les niveaux d'expression des ARNm ont été mesurés par analyse Microarray (human Clariom S assays) à partir de TFh int $\beta$ 7+ et int $\beta$ 7- triés (A), après 18h de stimulation avec des billes anti-CD3/CD28 (B) et après 2 jours de co-culture avec des LB naïfs (C). Les résultats sont présentés pour 5 donneurs. Les intensités relatives de l'expression de tous les gènes significativement différents, établies avec un seuil de 2, entre les groupes comparés sont représentés sur une heat-map (carte thermique) obtenue à partir du logiciel Transcriptome Analysis Console software d'Affymetrix®. Les valeurs d'expression des gènes sont en log<sub>2</sub>, et le niveau d'expression est représenté selon un gradient de couleur, du bleu, pour les valeurs les plus faibles, au rouge, pour les plus élevées, pour chaque population comparée. Les gènes représentés sont significativement différents en utilisant la moyenne des valeurs de 5 hybridations indépendantes (n=5) sur les puces à ARN, p-value < 0.05.

## La migration des LT CD4 mémoires dérivant de l'intestin à travers la monocouche de cellules endothéliales de la BHE est médiée par l'intégrine $\beta 2$ et l'intégrine $\beta 1$ , *in vitro*.

Dans la SEP, il a été décrit la présence de LT CD4 CCR9<sup>+</sup> dans le LCR des patients montrant que les LT intestinaux sont capables de migrer dans les organes cibles des MAI<sup>445</sup>. Dans ce contexte, nous nous sommes donc intéressés à la capacité de migration des LT CD4 mémoires dérivant de l'intestin à transmigration à travers la BHE en utilisant un modèle de transmigration, *in vitro*, avec une lignée de cellules endothéliales microvasculaires cérébrales humaines (hCMEC/D3). Pour l'étude de la transmigration des LT CD4, les cellules endothéliales ont été mises en culture sur un insert déposé dans une plaque de culture adaptée, formant une chambre supérieure, avec les cellules endothéliales, et une chambre inférieure, permettant de récolter les cellules ayant migré. La migration des LT CD4 exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  a été évaluée par cytométrie en flux. Les LT CD4 int $\beta 7^-$  et int $\beta 7^+$  ont été triés, marqués et remis en culture avec des PBMC, afin de se rapprocher au plus près des conditions physiologiques et stimulés avec des billes anti-CD3/anti-CD28 sur la nuit pour favoriser l'activation des intégrines. Après stimulation, les PBMC sont déposées sur la monocouche de cellules endothéliales pendant 8h. Nous avons pu déterminer que les LT CD4 mémoires int $\beta 7^-$  mais aussi int $\beta 7^+$  étaient capables de migrer à travers la couche de hCMEC/D3 (**Figure 35A**). De façon attendue et confirmant ainsi la spécificité de la migration des PBMC, les LT CD4 naïfs (CD4<sup>+</sup>, CD45RA<sup>+</sup>) n'étaient pas capables de traverser la monocouche de cellules endothéliales. Il est à noter que, bien que non significativement différents, le pourcentage de migration des LT CD4 mémoires exprimant l'intégrine  $\beta 7$  (moyenne 11,2 $\pm$  1,9%) était moins important que celui des LT CD4 mémoires int $\beta 7^-$  (moyenne 16,2 $\pm$  0,8%).

La migration à travers la BHE des lymphocytes fait notamment intervenir l'interaction des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et l' $\alpha L\beta 2$ , exprimées par les cellules du SI, avec leurs ligands respectifs VCAM-1 et ICAM-1. L'analyse de l'expression des intégrines  $\alpha 4\beta 1$  et l' $\alpha L\beta 2$  a montré que les LT CD4 mémoires int $\beta 7^+$  exprimaient l'intégrine  $\beta 1$  à un faible niveau et l'intégrine  $\beta 2$  à un niveau similaire aux LT CD4 mémoires int $\beta 7^-$  (**Figure 35B, à droite**). En accord avec les données de la littérature, les cellules hCMEC/D3 exprimaient ICAM-2 à l'état basal mais pas V-CAM-1 et ICAM-1 (**Figure 35B, à gauche**). L'ajout de TNF $\alpha$ , pendant 24 et 48h induisait une l'expression de V-CAM-1 et ICAM-1 ainsi qu'une augmentation de l'expression d'ICAM-2 et une légère augmentation de la sélectine-P, mimant ainsi l'augmentation de l'expression des molécules d'adhésion dans un contexte inflammatoire. En pré-incubant les PBMC avec un anticorps bloquant l'intégrine  $\beta 2$ , nous avons pu observer une forte diminution de la transmigration des LT CD4 mémoires int $\beta 7^+$  et int $\beta 7^-$  (**Figure 35C**). La migration des LT CD4 int $\beta 7^-$  et int $\beta 7^+$  était également diminuée avec l'anticorps anti-intégrine  $\beta 1$  mais de façon moins probante qu'avec l'anticorps anti-intégrine  $\beta 2$  puisque nous avons observé des variations

importantes de l'effet de cet anticorps dans les différentes expériences (**Figure 35D**). L'ensemble de ces résultats montrent que les LT CD4 mémoires dérivant de l'intestin étaient capables de migrer à travers la BHE, modélisée *in vitro* de façon intégrine  $\beta 2$  dépendante.



**Figure 35: La migration des LT CD4 mémoires dérivant de l'intestin à travers la monocouche de cellules endothéliales de la BHE est médiée par l'intégrine  $\beta 2$  et l'intégrine  $\beta 1$ , *in vitro*.**

**A.** Pourcentages de migration des LT CD4 naïfs, des LT CD4 mémoires totaux et des LT CD4 mémoires exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7^+$ . Les LT CD4 mémoires exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  sont triés et marqués avec du CTV ou du CFSE respectivement. Les cellules triées et marquées sont ensuite remises en culture avec des PBMC et stimulées avec des billes anti-CD3/anti-CD28 pendant une nuit. Les PBMC (avec les cellules CTV+ et CFSE+) sont ensuite déposées sur la monocouche de cellules endothéliales HCMEC/D3, sur l'insert de culture, pendant 8h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, et la migration est évaluée par cytométrie en flux. Moyenne  $\pm$  écart-type, n=3.

**B.** Superposition de l'expression d'ICAM-1, d'ICAM-2, de VCAM-1 et de la Sélectine-P sur les cellules endothéliales HCMEC/D3 stimulées ou non avec du TNF $\alpha$  (100U/ml) durant 24h ou 48h (à gauche) et superposition de l'expression de l'intégrine  $\beta 1$  et de l'intégrine  $\beta 2$  par les LT CD4 mémoires exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  (à droite).

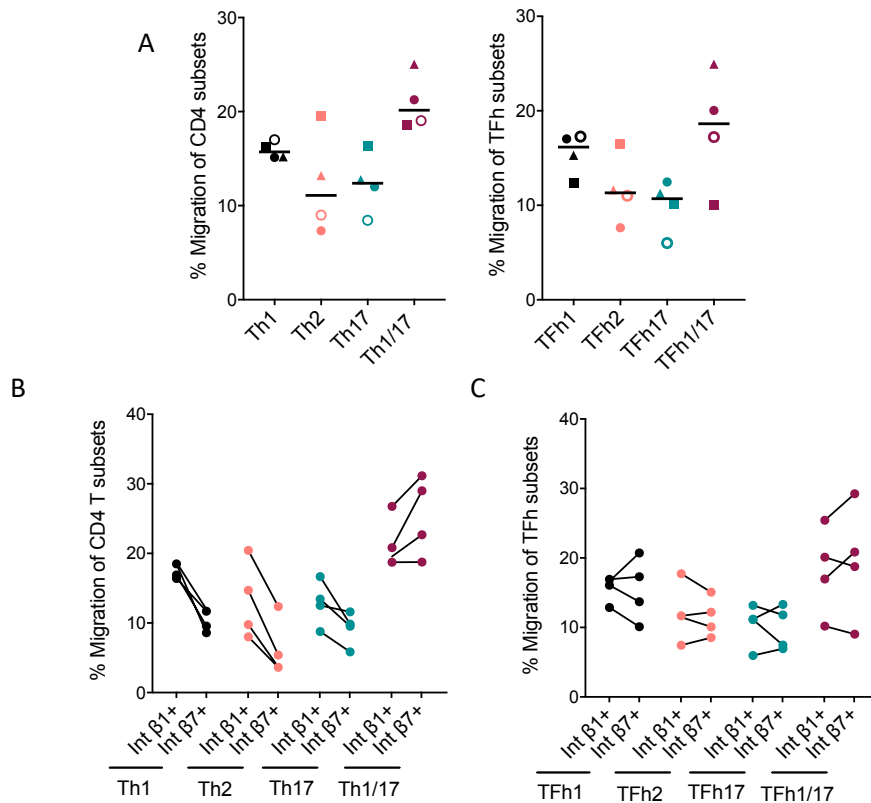
**C.** Pourcentages de migration des LT CD4 mémoires totaux, des LT CD4 mémoires int $\beta 7^-$  et int $\beta 7^+$ , préalablement triés et marqués comme en A. et pré-incubés ou non pendant 1 heure avec un anticorps bloquant anti-intégrine  $\beta 2$  ou un isotype contrôle (IgG1). Résultat représentatif de 4 expériences, moyenne  $\pm$  écart-type.

**D.** Pourcentage de migration des LT CD4 mémoires totaux et des LT CD4 mémoires exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  pré-incubés avec un anticorps bloquant anti-intégrine  $\beta 1$  ou un isotype contrôle. Résultat représentatif de 4 expériences sur 10, moyenne  $\pm$  écart-type.



### Les sous-populations des Th et TFh exprimant l'intégrine $\beta 7$ sont capables de migrer à travers la monocouche de cellules endothéliales de la BHE, *in vitro*.

Nous avons déterminé la capacité de migration des sous-populations de Th parmi les LT CD4 dérivant de l'intestin, ainsi que celle des sous-populations de cTFh dans notre modèle de transmigration. Les sous-populations, Th1, Th2, Th17 et Th1/17 totales étaient capables de migrer à travers la monocouche de cellules hCMEC/D3 (**Figure 36A, à gauche**). De façon intéressante, le pourcentage de migration des Th1/17, qui sont décrits comme étant une population pro-inflammatoire impliquée dans la physiopathologie de la SEP, était supérieur à celui des Th1, Th2 et Th17 bien que de manière non significative (n=4). De même, nous avons déterminé que les quatre sous-populations de cTFh étaient capables de migrer à travers la monocouche de cellules endothéliales (**Figure 36A, à droite**), avec une tendance à une migration plus élevée des TFh1/17. Nous nous sommes ensuite intéressés à la capacité de migration des sous-populations de Th et TFh exprimant l'intégrine  $\beta 1+$  (int $\beta 7^-$ ) ou intégrine  $\beta 7+$  (int $\beta 1^{\text{low}}$ ). L'ensemble des sous-population de Th int $\beta 1+$  et int $\beta 7+$  était capable de migrer à travers notre modèle de BHE (**Figure 36B**). Concernant la migration des sous populations de Th1, Th2 et Th17, nous avons observé une plus faible migration dans le compartiment int $\beta 7+$  comparé aux int $\beta 1+$ . En revanche, les Th1/17 int $\beta 7+$  étaient capables de migrer aussi efficacement que les Th1/17 int $\beta 1+$ , et toujours plus efficacement que les autres sous-populations. Concernant les TFh  $\beta 7+$ , la migration des sous-populations était similaire aux sous-population int $\beta 1+$ , contrairement à ce qui a été observé pour les Th (**Figure 36C**). L'ensemble de ces résultats montre qu'à la fois les Th et les TFh, exprimant l'intégrine  $\beta 7$ , sont capables de migrer à travers notre modèle de BHE, *in vitro*.



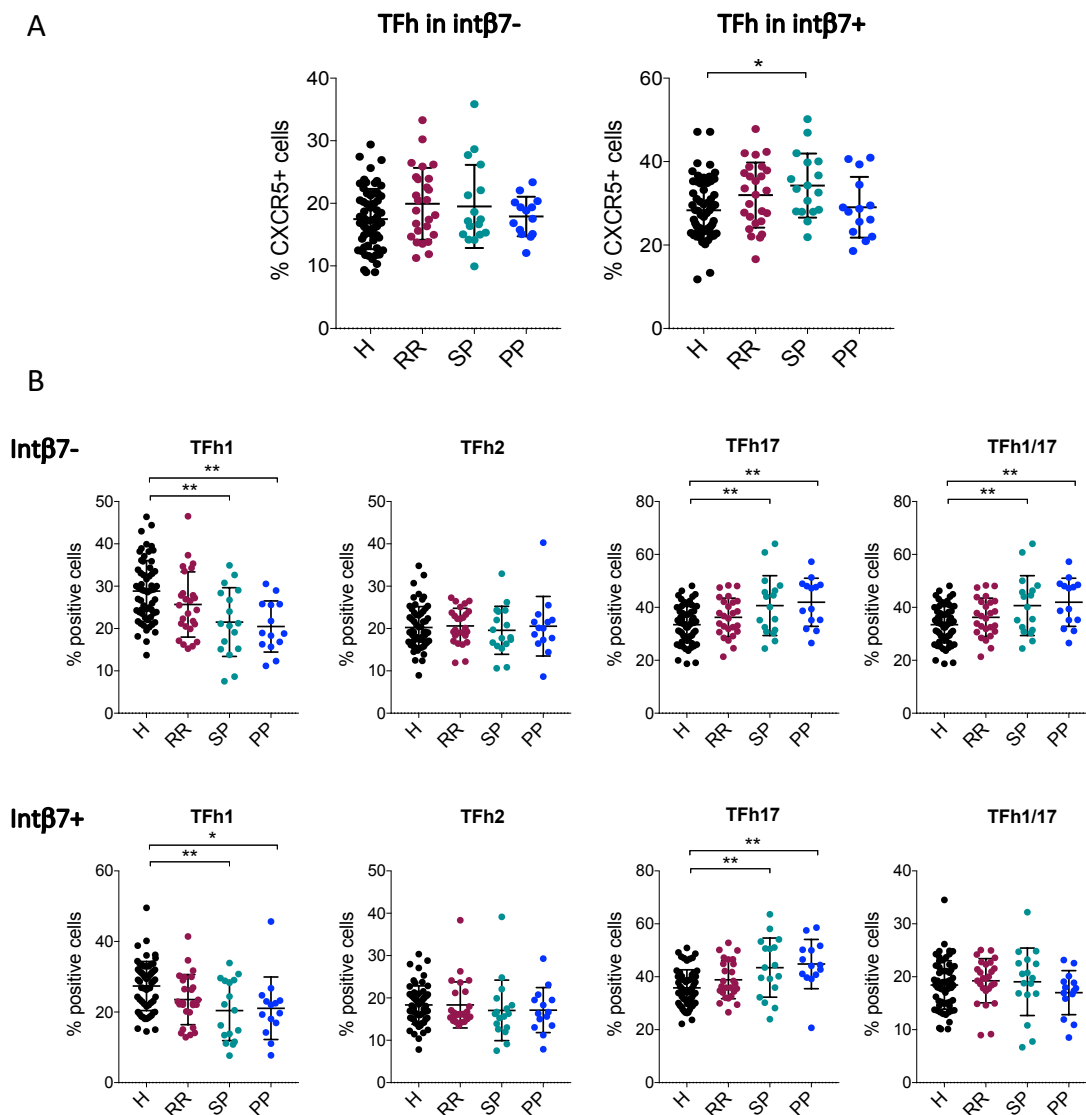
**Figure 36: Les sous-populations des Th et TFh exprimant l'intégrine β7 sont capables de migrer à travers la monocouche de cellules endothéliales de la BHE *in vitro*.**

Les sous-populations de LT CD4 mémoires sont triées, selon l'expression de CXCR3 et CCR6, et marquées avec du CTV. Les cellules triées et marquées sont ensuite remises en culture avec des PBMC et stimulées avec des billes anti-CD3/anti-CD28 pendant une nuit à 37°C. Chaque population (PBMC contenant la population CTV+) est ensuite déposée sur la monocouche de cellules endothéliales pendant 8h à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>. Les populations sont ensuite identifiées par leur expression du CTV, de CXCR5, de l'intégrine β1 et de l'intégrine β7 par cytométrie en flux. (A) Pourcentages de migration des sous-populations de Th totaux (CXCR5-, CTV+) et des TFh totaux (CXCR5+, CTV+). (B, C) Pourcentages de migration des différentes sous-populations de Th (B) et de TFh (C) selon leur expression de l'intégrine β1 et β7, n=4.

**La proportion de TFh circulants est orientée en faveur d'un phénotype capable d'aider les LB chez les patients en phase SPMS et PPMS.**

L'analyse de la proportion des sous-populations de TFh circulants des patients en phase RRMS, SPMS, et PPMS a été effectuée par cytométrie en flux, et comparée avec celle de sujets sains. Le pourcentage de LT CD4 mémoires CXCR5+ était augmenté, parmi les LT CD4 mémoires intβ7+, en phase SPMS (moyenne 34,3 ± 7,7%) comparés aux sujets sains (moyenne 28,3 ± 7%) (Figure 37A à droite). En revanche, il n'y avait pas de différence dans le pourcentage de CXCR5+, parmi les LT CD4 mémoires intβ7-, chez les patients SEP, toutes phases confondues, comparés aux sujets sains (Figure 37A à gauche). L'analyse de la répartition des sous-populations TFh1, TFh2, TFh17 et TFh1/17 lors des différentes phases de la maladie a montré que la proportion des sous-populations de TFh, aussi bien intβ7- que intβ7+, était altérée chez les patients en phases SPMS et PPMS, en faveur des sous-types

aidant les LB naïfs (diminution du pourcentage de TFh1 et augmentation du pourcentage de TFh17), comparés aux sujets sains (**Figure 37B**). La proportion des TFh1/17 parmi les TFh intβ7- était également augmentée dans les phases SPMS et PPMS. Dans les phases progressives de la SEP, nous avons donc pu constater une augmentation de la proportion de TFh dans le compartiment intβ7+ ainsi qu'une altération de la proportion des sous-types de TFh (intβ7- et intβ7+) vers un phénotype aidant les LB naïfs comparés aux donneurs sains.



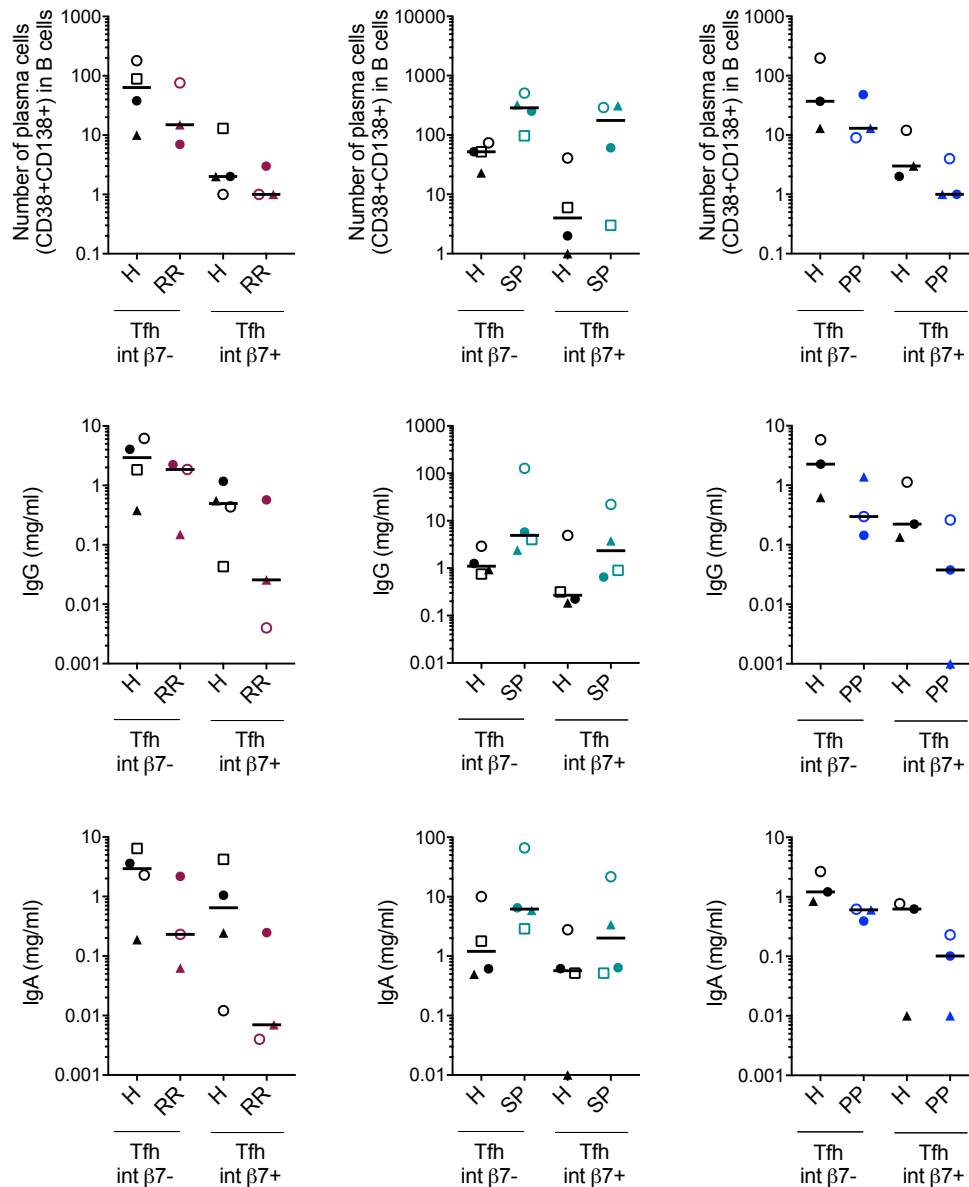
**Figure 37: La proportion de TFh circulants est orientée en faveur d'un phénotype capable d'aider les LB chez les patients en phase SPMS et PPMS.**

**A.** Pourcentage de TFh (CXCR5+) parmi les LT CD4 mémoires exprimant ou non l'intégrine β7 chez les patients SEP (RRMS, SPMS et PPMS) et les donneurs sains (H). One-way ANOVA, moyenne ± écart-type, \* p<0.05.

**B.** Sur la ligne du haut, le pourcentage de chaque sous-population de TFh circulants, parmi les LT CD4 mémoires intégrine β7-, chez les patients SEP comparés aux donneurs sains. Sur la ligne du bas, le pourcentage de chaque sous-population de TFh circulants parmi les LT CD4 mémoires exprimant l'intégrine β7. One-way ANOVA, moyenne ± écart-type, \* p<0.05, \*\*p<0.01.

**La capacité d'aide aux LB naïfs des TFh intégrine  $\beta 7^+$  est supérieure chez les patients SPMS comparés aux patients en RRMS, en PPMS et aux donneurs sains, *in vitro*.**

Le compartiment des TFh étant altéré dans la SEP, nous nous sommes intéressés à la fonction des TFh int $\beta 7^-$  et int $\beta 7^+$  des patients en phase RRMS, SPMS et PPMS, qui a été évaluée en réalisant des co-cultures entre des TFh provenant de patients ou de donneurs sains, appariés selon l'âge et le sexe, et des LB naïfs allogéniques provenant d'un donneur sain unique (**Figure 38**). Nous avons pu observer que, chez les patients RRMS et PPMS, les TFh int $\beta 7^-$  et int $\beta 7^+$  induisaient un nombre absolu de plasmocytes, d'IgG et d'IgA sécrétés similaire comparés aux donneurs sains. En revanche, les TFh int $\beta 7^+$  provenant de patients en phase SPMS induisaient une différenciation des LB naïfs (nombre de plasmocytes) et une sécrétion d'IgG plus importantes que les TFh int $\beta 7^+$  de sujets sains (non significatif) et équivalente à l'activité des TFh  $\beta 7^-$  des donneurs sains. Les TFh int $\beta 7^-$  de patients SPMS étaient également capables d'induire une différenciation des LB plus importante que les TFh int $\beta 7^-$  de donneurs sains. Ces résultats indiquent donc que la fonction d'aide aux LB des TFh, notamment de ceux dérivés de l'intestin, est augmentée spécifiquement en phase SPMS.



**Figure 38: La capacité d'aide aux LB naïfs des TFh intégrine  $\beta 7^-$  et intégrine  $\beta 7^+$  est supérieure chez les patients SPMS comparés aux patients en RRMS, en PPMS et aux donneurs sains, *in vitro*.**

Sur la ligne du haut, nombres absolus de plasmocytes (CD38+CD138+) des co-cultures allogéniques de 12 jours, entre des LB naïfs de donneur sain, et des TFh exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$ , isolés de patients en phase RRMS, SPMS et PPMS ou de donneurs sains allogéniques par cytométrie en flux (ratio 1 :1, en présence de SEB). Concentrations d'IgG (ligne du milieu) et d'IgA (ligne du bas) dans les surnageants de co-cultures à jour 12. Toutes les co-cultures allogéniques ont été réalisées avec des LB naïfs provenant du même donneur. n=4 pour les patients SPMS, n=3 pour les patients RRMS et PPMS.

Patients	Gender	Age	Clinical phase	EDSS	Treatment	Age at onset
MS125	F	33	CIS	1	None	ND
MS168	F	20	RRMS	1	Dimethyl Fumarate	ND
MS69	F	45	RRMS	1	Dimethyl Fumarate	38
MS79	M	30	RRMS	1	Dimethyl Fumarate	23
MS104	F	47	RRMS	ND	Glatiramer Acetate	ND
MS120	M	42	RRMS	1	Glatiramer Acetate	27
MS 4	M	54	RRMS	4	Interferon $\beta$	44
MS106	M	47	RRMS	2,5	Interferon $\beta$	27
MS124	M	59	RRMS	4	Interferon $\beta$	17
MS72	F	28	RRMS	1	Interferon $\beta$	25
MS83*	M	58	RRMS	4	Interferon $\beta$	17
MS90	F	55	RRMS	1,5	Interferon $\beta$	29
MS94	F	29	RRMS	1	Interferon $\beta$	27
MS99	M	55	RRMS	3,5	Interferon $\beta$	48
MS 17	M	49	RRMS	4	Methylprednisolone	27
MS129	F	51	RRMS	ND	Methylprednisolone	ND
MS 49	M	26	RRMS	3,5	None	12
MS105	F	37	RRMS	ND	None	ND
MS61	F	31	RRMS	1.5	None	30
MS88	F	30	RRMS	0	None	30
MS93	F	45	RRMS	6	None	19
MS96*	F	26	RRMS	1	None	25
MS122	F	35	RRMS	1	None	ND
MS68	F	53	RRMS	1	Teriflunomide	44
MS71	F	56	RRMS	1,5	Teriflunomide	52
MS98	M	27	RRMS	1,5	Teriflunomide	23
MS 3	M	42	SPMS	6	Methylprednisolone + Interferon $\beta$	21
MS 48*	F	75	SPMS	6,5	Biotin	54
MS176*	M	50	SPMS	ND	Biotin	27
MS47	F	38	SPMS	6	Cyclophosphamide	22
MS65	F	38	SPMS	6	Cyclophosphamide	20
MS85	F	47	SPMS	2.5 (2013)	Cyclophosphamide	43
MS164*	M	61	SPMS	ND	Interferon $\beta$	54
MS111	M	53	SPMS	7,5	Methotrexate	23
MS78	F	48	SPMS	3,5	Methotrexate	33
MS 13	M	53	SPMS	3,5	Methotrexate + Methylprednisolone	41
MS 18	M	50	SPMS	6,5	Methotrexate + Methylprednisolone	17
MS 40	M	59	SPMS	3	Methotrexate + Methylprednisolone	36
MS70	M	59	SPMS	6	Methotrexate + Methylprednisolone	40
MS 35	F	42	SPMS	4	Methylprednisolone	26
MS116	F	65	SPMS	4	Methylprednisolone	56
MS67	F	76	SPMS	ND	Methylprednisolone	31
MS81	F	54	SPMS	6	Methylprednisolone	23
MS108	M	67	SPMS	ND	None	29
MS128*	F	72	SPMS	ND	None	ND
MS92	M	62	PPMS	5,5	Methylprednisolone + Cyclophosphamide	56
MS 46	M	50	PPMS	6,5	Methylprednisolone + Mycophenolate mofetil	45
MS82	M	52	PPMS	7	Methylprednisolone + Mycophenolate mofetil	21
MS115	M	73	PPMS	ND	Biotin	60
MS 52	M	69	PPMS	ND	Cyclophosphamide	63
MS110	M	36	PPMS	2 (2003)	Cyclophosphamide	22
MS100	M	59	PPMS	3,5	Methotrexate	50
MS113*	M	59	PPMS	4	Methotrexate	55
MS75	M	54	PPMS	4	Methotrexate	46
MS89	F	61	PPMS	6	Methotrexate	38
MS114	M	68	PPMS	ND	Methylprednisolone	68
MS76*	F	65	PPMS	7,5	Methylprednisolone	43
MS95	F	55	PPMS	4	Methylprednisolone	38
MS97	F	55	PPMS	6	Methylprednisolone	42
MS149*	F	55	PPMS	ND	Methylprednisolone	38

**Figure 39: Données cliniques des patients SEP (ND, Non déterminé ; \* patients utilisés pour les expériences de co-cultures allogéniques).**

## Discussion

De nombreuses études ont révélé que le microbiote intestinal est essentiel au bon fonctionnement de l'organisme et qu'il peut participer au développement de nombreuses maladies. Les lymphocytes intestinaux, dont les propriétés sont encore peu décrites et sont directement impactées par la composition du microbiote intestinal, peuvent participer, au même titre que les autres cellules du SI, à la réponse immunitaire dans les organes cibles de pathologies autoimmunes. Notre étude montre que les Th ainsi que les TFh de sujets sains, exprimant l'intégrine  $\beta 7$ , présentent un profil plus inflammatoire et plus activé comparés aux Th et TFh intégrine  $\beta 7^-$ . Nous avons pu constater une différence d'expression des molécules d'activation ainsi que du profil cytokinique entre les Th et TFh exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  suggérant que le passage de ces cellules au niveau des GALT impacte le phénotype des LT. En effet, dans le compartiment  $\text{int}\beta 7^+$ , la proportion de Th exprimant le CD161 et le CD69 est supérieure aux Th  $\text{int}\beta 7^-$ . Il a été montré que l'expression de CD161 par les LT CD4 est un marqueur de LT mémoires producteurs d'IL-17. Une étude a révélé que les LT CD4 CD161<sup>int</sup> sont augmentés dans l'intestin de patients atteints de la maladie de Crohn, et ces cellules, isolées à partir du sang de patients, produisent davantage d'IL-17 suite à une stimulation PMA/ionomycine<sup>455</sup>. En outre, dans la SEP, il a été montré une co-production d'IFN $\gamma$  et de TNF $\alpha$  spécifiquement par des LT CD4 CD69+, isolés du sang des patients SEP et stimulés avec les peptides de la myéline<sup>456</sup>. Nos résultats montrent que les LT intestinaux, chez les sujets sains, possèdent des caractéristiques de cellules plus inflammatoires, qui pourraient potentiellement participer à l'inflammation dans un contexte pathologique. Cependant, nous n'avons pas observé une augmentation du pourcentage de LT CD4 IL-17A+ parmi les LT CD4 exprimant l'intégrine  $\beta 7$ , comparés aux LT CD4  $\text{int}\beta 7^-$ . En revanche, le pourcentage de LT CD4 IFN $\gamma^+$ , IL-22+ et MIP-1 $\beta^+$  est augmenté dans les LT CD4  $\text{int}\beta 7^+$ . Il a été montré que l'IL-22 est notamment impliqué dans la perturbation de l'intégrité de la BHE<sup>313</sup>.

En outre, nous avons pu constater que, parmi les LT CD4  $\text{int}\beta 7^+$ , la proportion de TFh circulants est supérieure comparée au compartiment  $\text{int}\beta 7^-$ . Nous avons observé que l'expression d'ICOS et PD-1 par les TFh  $\text{int}\beta 7^+$  est supérieure à celle des TFh  $\text{int}\beta 7^-$ . L'expression d'ICOS et de PD-1 est associée à un phénotype mémoire activé. Cependant, nous n'avons pas regardé la co-expression de ces marqueurs au sein de la population des TFh ( $\text{int}\beta 7^-$  et  $\text{int}\beta 7^+$ ). Le niveau d'expression de CCR7 parmi les TFh va également participer à définir les cTFh mémoires activés qui sont caractérisés comme étant ICOS+PD-1++CCR7<sup>low</sup><sup>203</sup>. La majorité des TFh mémoires circulants sont ICOS-PD-1-, seule une petite proportion de TFh exprime ICOS et PD-1 de façon comparable aux GC TFh (environ 0,3%). Il serait donc intéressant de définir l'expression de CCR7 (CCR7+ ou CCR7<sup>low</sup>) au sein de la population des TFh  $\text{int}\beta 7^+$  PD-1+ICOS+. Il a notamment été montré que les TFh circulants CCR7<sup>low</sup>PD-1<sup>high</sup> constituent la population la plus efficace pour induire la différenciation des LB mémoires, après vaccination contre la

grippe<sup>203</sup>. Par ailleurs, nous avons observé que la proportion de TFh exprimant l'IFN $\gamma$ , MIP-1 $\beta$  ainsi que le GM-CSF est plus importante dans le compartiment int $\beta$ 7<sup>+</sup> bien que nettement inférieure aux non-TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>. Le GM-CSF est une cytokine essentielle dans l'induction de l'EAE<sup>457</sup>. Cependant, l'effet de la sécrétion de GM-CSF, par les TFh, sur les LB n'a pas été décrit. Toutefois, la capacité des TFh à sécréter des cytokines pro-inflammatoires peut participer à maintenir un environnement inflammatoire.

Notre étude a permis de mettre en évidence une différence de capacité d'aide aux LB entre les TFh circulants exprimant l'intégrine  $\beta$ 7 et les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>. En effet, les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> induisent une faible différenciation en plasmocytes ainsi qu'une faible sécrétion d'IgG et d'IgA des LB naïfs, comparés aux TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>. Les plasmablastes (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>-</sup>) et plasmocytes (CD19<sup>+</sup>CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup>) apparaissent à partir du 4<sup>ème</sup> jour et 5<sup>ème</sup> jour, respectivement, dans les co-cultures contenant les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et int $\beta$ 7<sup>+</sup> indiquant que les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> fournissent les signaux nécessaires à la prolifération, la survie, et la différenciation des LB naïfs. Cependant, l'amplitude de la différenciation des LB observée est plus faible avec les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup>, indiquant que les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> induisent une plus faible différenciation des LB naïfs dès le début de l'interaction TFh:LB. Malgré une induction de la différenciation et de sécrétion d'Ig minime par rapport aux TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>, les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> sont tout de même capables d'induire une différenciation des LB naïfs, contrairement aux non-TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et int $\beta$ 7<sup>+</sup>, et sont capables de promouvoir un changement de classe des Ig. De plus, les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> induisent une plus forte différenciation des LB naïfs en plasmocytes ainsi que sécrétion d'IgG et IgA par rapport aux non-TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> et int $\beta$ 7<sup>-</sup> (significatif avec un t-test de Student apparié). La faible amplitude de la réponse des LB, dès les premiers jours de co-culture avec les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup>, suggère un déficit dans leur capacité à maintenir la survie des LB et/ou dans l'initiation des étapes de « priming » des LB naïfs. Nous avons pu montrer qu'il ne s'agit pas d'un défaut dans l'expression des molécules de co-stimulation ou d'inhibition (ICOS, CD40-L, OX40, PD-1, CTLA-4) impliquées dans l'interaction entre les TFh et les LB, ni d'un défaut de sécrétion d'IL-21. La prolifération des TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> jusqu'au 5<sup>ème</sup> jour de co-culture suggère que la plus faible amplitude de réponse n'est pas due à une mortalité précoce des TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> en culture. En effet, dès le 4<sup>ème</sup> et 5<sup>ème</sup> jour, le nombre de LB en culture avec les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> est plus faible qu'avec les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>, alors que le nombre de LT CD4 est similaire entre les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et int $\beta$ 7<sup>+</sup> et supérieure à celui des non-TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et int $\beta$ 7<sup>+</sup>. Cependant, il est possible que les cellules ne soient pas en condition optimale, et plus affectées que les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> par les manipulations nécessaires à leur obtention, mais la forte expression des molécules de co-stimulation ne semble pas indiquer que cela soit le cas. La chute du nombre de TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup>, observée à partir du 5<sup>ème</sup> jour de culture, peut être également la conséquence de signaux de survie insuffisants fournis par les LB, ou d'un défaut de l'interaction entre les TFh et les LB ne parvenant plus à maintenir une stimulation suffisante. En effet, les non-TFh (int $\beta$ 7<sup>+</sup> et int $\beta$ 7<sup>-</sup>) en culture avec les LB naïfs ne prolifèrent pas ou très peu par rapport aux TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> signifiant que les



TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> interagissent avec les LB naïfs et reçoivent des signaux de survie et de prolifération dès le début de la culture. L'analyse de la sécrétion d'autres cytokines, à 2 jours de co-culture, n'a pas montré de différence significative dans la sécrétion d'IL-10, IL-9, IL-17F, IL-6, IL-22, IL-13, TNF $\alpha$  et IL-4 entre les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et int $\beta$ 7<sup>+</sup>, et ne peut donc pas expliquer l'aide plus faible apportée par les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> (non montré). Nous n'avons également pas observé de différence dans la cinétique d'expression de CD28 et CD27 (non montré) entre les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> et int $\beta$ 7<sup>-</sup> en co-culture avec les LB naïfs. Cependant, il serait intéressant d'évaluer l'expression d'autres molécules impliquées dans l'interaction TFh :LB tels que les molécules de la famille de SLAM et l'IL-21R, ou dans l'état d'activation des TFh tels que GITR et Tim-3 ainsi que la sécrétion de CXCL13. En effet, une étude a par exemple montré, dans le contexte du cancer du sein, que les TFh Tim-3<sup>+</sup> induisent une plus faible différenciation des LB naïfs comparés aux TFh Tim-3<sup>-</sup><sup>458</sup>. Toutefois, la proportion de cTFh exprimant Tim-3 est très faible chez les sujets sains.

Il est également possible que l'effet observé résulte, non pas d'un défaut de capacité intrinsèque des TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> à aider les LB, mais d'une plus forte proportion ou capacité régulatrice des TFr int $\beta$ 7<sup>+</sup> qui pourraient inhiber la réponse des LB, directement via leur interaction avec les LB ou les TFh, ou indirectement via leur sécrétion cytokinique. Nous n'avons pas constaté de différence dans la proportion des TFr int $\beta$ 7<sup>+</sup> et int $\beta$ 7<sup>-</sup> circulants, sélectionnés en fonction de leur expression de FoxP3. Pour déterminer si la faible capacité d'aide aux LB des TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> était due à une plus forte activité TFr, nous avons souhaité réaliser des co-cultures entre les LB naïfs et les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> ou int $\beta$ 7<sup>-</sup> déplétés ou non en TFr, ou avec les non-TFh, déplétés ou non en Treg. Cependant, l'utilisation du marqueur Foxp3 n'étant pas possible, nous avons exclu les LT CD4 mémoires CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup> lors du tri cellulaire des populations de LT CD4 mémoires, afin d'étudier l'impact de l'absence de ces cellules dans les cultures. Dans ces expériences, nous n'avons pas constaté de différence entre les co-cultures avec les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> avec et sans TFh CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>, ni dans celles réalisées avec les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> avec ou sans TFh CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>. Cependant, il a été montré que les TFr, du GC ainsi que les circulants, n'expriment pas tous CD25 sans que cela n'impacte leur activité suppressive<sup>459 460</sup>. Nous avons effectivement constaté qu'environ 10 à 15% des TFr FoxP3<sup>+</sup> ne sont pas compris dans les TFh CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>, indiquant que nous n'avons pas enlevé l'ensemble des TFr dans nos expériences. Nous avons donc voulu tester directement l'effet inhibiteur potentiel des LT CD4 CXCR5<sup>+</sup> int $\beta$ 7<sup>+</sup> dans des co-cultures avec des TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et des LB naïfs. Pour cela, nous avons ajouté aux co-cultures entre les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et les LB naïfs, un nombre croissant de TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup>. Nous nous sommes assurés que le nombre de cellules totales dans les cultures ne soit pas limitant pour l'aide aux LB naïfs. L'ajout des TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> n'a pas modifié l'aide aux LB naïfs apportée par les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> (non montré) suggérant que les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> n'ont pas d'effet inhibiteur sur le déroulement de la co-culture avec les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>. Pour éclaircir la question de l'implication des TFr, et au vu des difficultés pour les isoler, il serait envisageable de tester

directement la capacité suppressive des TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et int $\beta$ 7<sup>+</sup> (CD25<sup>+</sup>CD127<sup>low</sup>), représentant en moyenne 80% des TFh dans le compartiment int $\beta$ 7<sup>+</sup>.

Par ailleurs, les signaux nécessaires au priming des LB naïfs et à leur différenciation impliquent une interaction stable et longue entre les LB et les TFh, contrairement à la réactivation des LB mémoires, présentant une capacité d'activation et de prolifération supérieure aux LB naïfs. Il est possible que la qualité de l'interaction initiale des TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> avec les LB naïfs ne soit pas suffisante pour assurer une différenciation optimale, mais que leur interaction soit facilitée avec les LB mémoires. Nous avons réalisé des co-cultures entre les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> ou int $\beta$ 7<sup>+</sup> avec des LB mémoires (CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>), et n'avons pas observé de différence dans la différenciation des LB mémoires cultivés avec des TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> ou int $\beta$ 7<sup>+</sup>, soutenant l'hypothèse d'un défaut de priming des LB naïfs. Toutefois, dans nos expériences, nous avons également pu observer une aide de la part des non-TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> indiquant que l'aide fournie aux LB mémoires n'est pas restreinte aux TFh dans nos cultures. Néanmoins, contrairement aux non-TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>, les non-TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> n'induisent pas de différenciation des LB mémoires dans nos cultures. Morita et al., ont montré que les CXCR5<sup>-</sup> ne sont pas capable d'induire la différenciation des LB mémoires, contrairement aux CXCR5<sup>+</sup><sup>209</sup>. Il est à noter que, dans leurs expériences, les auteurs ont trié les LB mémoires selon leur expression du CD27 (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>), incluant les LB de la zone marginale, aussi appelé les LB mémoires non commutés (CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, IgD<sup>+</sup>, IgM<sup>+</sup>). Les LB de la zone marginale ont été décrit comme une population de LB impliquée dans la réponse humorale LT-indépendante. En effet, il est possible par exemple que l'IL-21 sécrétée par les Th17 soit suffisante pour induire la sécrétion d'IgG par les LB mémoires (CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>), mais pas par les LB de la zone marginale résultant en une différence de capacité d'aide entre les TFh et les non-TFh selon que les cocultures comprennent ou non les LB de la zone marginale. De même, il est également envisageable que l'interaction entre les LT CD4 et les LB mémoires soit gênée en présence des LB de la zone marginale, et que seuls les TFh arrivent à fournir des signaux assez forts pour induire la différenciation des LB mémoires (CD19<sup>+</sup>, CD27<sup>+</sup>, IgD<sup>-</sup>) en culture. L'hétérogénéité des populations de LB mémoires pourrait expliquer les différences observées dans la différenciation en plasmocytes dans nos cultures. Il serait donc nécessaire de doser la concentration d'IL-21 dans nos surnageant de co-cultures, ce qui pourrait permettre d'expliquer la réponse des LB mémoires non dépendante des TFh. En outre, il a été montré que, parmi les TFh mémoires circulants, seule la population de TFh mémoires PD-1<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup>CXCR5<sup>+</sup> est capable d'induire la différenciation et la sécrétion d'Ig par les LB mémoires (CD19<sup>+</sup>CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup>). Les TFh mémoires PD-1<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>, PD-1<sup>-</sup>CXCR3<sup>+</sup> et PD-1<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup> induisent une sécrétion d'Ig similaire aux CXCR5<sup>-</sup><sup>204</sup>. Les TFh mémoires PD-1<sup>-</sup>CXCR3<sup>-</sup> représentent la majorité des cTFh (environ 40%), tandis que les TFh mémoires PD-1<sup>+</sup>CXCR3<sup>-</sup> représentent environ 13% des cTFh. Il est à noter que les TFh1 et les TFh1/17 expriment le marqueurs CXCR3, indiquant que ces populations ne sont pas les plus efficaces dans l'aide des LB mémoires, contrairement aux TFh2 et

TFh17. Au vu de la faible proportion des TFh PD-1+CXCR3-, mettre en évidence une différence entre les TFh et les non-TFh dans le cas de co-cultures avec des LB mémoires (CD19+CD27+IgD-) nécessiterait d'isoler spécifiquement cette population. De plus, il est possible que l'aide aux LB mémoires similaire observée entre les TFh intβ7- et intβ7+ soit la résultante d'une répartition différente des proportions de chaque population décrite, en faveur d'un plus grand nombre de cTFh PD-1+CXCR3- parmi les TFh intβ7+. Dans le cadre d'une co-culture avec des LB mémoires, il serait donc intéressant de tester la capacité d'aide des TFh intβ7+ et intβ7- comparativement aux non-TFh en fonction de leur expression de PD-1 et de CXCR3.

L'analyse transcriptomique des TFh intβ7- et TFh intβ7+ n'a pas mis en évidence un défaut d'expression de gènes connus comme étant liés directement à l'interaction entre TFh et LB, et a révélé, au contraire, une forte homogénéité du profil d'expression génique entre ces deux populations. De plus, le fait de stimuler les TFh, par le signal 1 et 2 ou par des LB naïfs, réduit davantage la différence du niveau d'expression de gènes, comparés aux TFh non stimulés, récupérés directement après tri cellulaire. Toutefois, nous avons constaté que le niveau d'expression du gène CMC1, codant pour la protéine « COX assembly mitochondrial protein homolog », est inférieure dans les TFh intβ7+, non stimulés, comparés aux TFh intβ7-. La protéine COX est un composant du complexe MITRAC (mitochondrial translation regulation assembly intermediate of cytochrome c oxidase complex) qui régule l'assemblage de la cytochrome c oxydase, enzyme terminale de la chaîne respiratoire mitochondriale. Il a été montré que COX est impliqué dans le contrôle métabolique, après activation des LT, en faveur d'un métabolisme glycolytique. Chez des souris ayant des LT déplété en COX10 (TCOX<sup>-/-</sup>), après infection, il a été montré que les TFh (PD-1+, CXCR5+) ne sont pas capables de soutenir la formation de GC, sans impacter leur nombre, suggérant que la dysfonction de COX impacte la fonctionnalité des TFh<sup>461</sup>. Il serait intéressant d'étudier plus profondément le métabolisme des TFh intβ7+ qui serait éventuellement différent de celui des TFh intβ7-, et pourrait impacter leur fonction. L'expression différentielle d'autres gènes a été mise en évidence, telle que la surexpression du gène codant pour les protéines ASB, mais également la sous-expression du gène codant pour la protéine LIN52, impliquée dans le cycle cellulaire<sup>462</sup>, par les TFh intβ7+. Cependant, leurs rôles dans les cellules immunitaires, et en particulier les TFh, sont encore très peu décrits mais peuvent constituer une piste à explorer.

L'analyse transcriptomique nous a apporté d'autres informations sur la caractérisation des non-TFh et TFh intβ7+. En effet, le niveau d'expression augmenté du gène CCL5 dans les TFh intβ7+, aussi connu sous le nom de RANTES (regulated on activation, normal T cell expressed and secreted), sans stimulation, peut être intéressant dans le contexte de la SEP. Concernant les TFh, il n'y a pas de donnée montrant l'implication de CCL5 dans l'interaction entre les LB et les TFh mais l'expression de cette chimiokine pourrait toutefois participer à maintenir un environnement inflammatoire, sans avoir un rôle

spécifique dans l'aide aux LB. En effet, CCL5 est une chimiokine impliquée notamment dans l'attraction des LT, éosinophiles, et macrophages ainsi que dans l'activation des cellules NK. Le niveau endogène de CCL5 dans le LCR de donneurs sains est très faible, mais son niveau est augmenté dans le LCR des patients SEP, avec une association entre l'IFN $\gamma$  et le CCL5<sup>463</sup>. En outre, une étude a montré que le niveau de CCL5 dans le LCR des patients SEP (RRMS et PPMS) est particulièrement élevé dans les phases actives et corrélé avec la concentration d'IL-1 $\beta$  dans le LCR<sup>464</sup>. Dans le modèle EAE, les souris déficientes en CCR1, CCR3 et CCR5, ligand de CCL5, sont résistantes à l'induction de l'EAE<sup>465 466</sup>. La forte élévation du niveau de CCL5 dans le LCR des patients dépend à la fois de sa production par les cellules immunitaires infiltrées dans le SNC, mais reflète également la production locale par les astrocytes activés<sup>467</sup>. De façon intéressante, nous avons également observé une augmentation du niveau d'expression de CCL5 dans les non-TFh int $\beta$ 7+ (CXCR5-) comparés aux non-TFh int $\beta$ 7- (non montré), en condition non stimulés et récupérés après tri cellulaire, suggérant qu'il s'agit davantage d'une propriété des LT CD4 dérivant de l'intestin, plus que d'une spécificité des TFh int $\beta$ 7+. Dans ce sens, la comparaison de l'expression des gènes des TFh int $\beta$ 7+ et des non-TFh int $\beta$ 7+ permettrait de mieux caractériser les populations intestinales et voir s'il existe des différences de profil d'expression génique au sein des populations exprimant l'intégrine  $\beta$ 7. Dans ce contexte, il serait intéressant d'étudier plus en profondeur la sécrétion de CCL5 par les LT CD4 int $\beta$ 7+, dont les TFh int $\beta$ 7+, qui pourraient participer à l'inflammation via une potentielle sécrétion plus importante de CCL5. D'autre part, il a été montré que la majorité des TFh mémoires circulants exprime la L-sélectine ou CD62L, marqueurs associés aux LT CD4 centraux mémoires<sup>468</sup>. L'expression des ligands de CD62-L par les HEV des SLO a été proposée comme une voie de migration des TFh dans les SLO. L'analyse transcriptomique a révélée que les TFh int $\beta$ 7+, stimulés ou non, présentent une plus faible expression de CD62L comparés aux TFh int $\beta$ 7-, n'apportant à priori pas d'indication sur l'origine de la faible aide des TFh int $\beta$ 7+ aux LB naïfs, mais indiquant que les TFh int $\beta$ 7+ ont un profil davantage associé à des TFh effecteurs. La plus faible expression de CD62L par les TFh int $\beta$ 7+ peut également indiquer que la recirculation de ces cellules dans les ganglions lymphatiques pourrait être un évènement moins fréquent que pour les TFh int $\beta$ 7-. Toutefois, une étude a révélé que, dans le cas d'une infection virale, la génération de TFh effecteurs lors d'un second challenge antigénique ne dépend pas de l'expression de CD62-L par les TFh mémoires<sup>469</sup>.

Concernant spécifiquement l'analyse transcriptomique des TFh int $\beta$ 7- et int $\beta$ 7+ en co-culture avec les LB naïfs durant 2 jours, il est possible que la forte similarité du profil d'expression génique des deux populations de TFh soit le reflet d'un timing trop précoce dans l'interaction TFh:LB. D'autant plus que nous n'avons pas observé de différence dans le profil des gènes exprimés par les LB cultivés 2 jours avec les TFh int $\beta$ 7- ou les TFh int $\beta$ 7+. Il est également envisageable que la différence, en termes de

niveau d'expression des gènes entre les TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup> et int $\beta$ 7<sup>+</sup>, pourrait se situer au niveau de gènes non codants.

En résumé, nous n'avons pas déterminé les raisons pour lesquelles la fonction des TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> est altérée dans nos expériences mais, à l'image des DC ou macrophages hyporéactifs dans l'intestin, il est possible que les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> induisent une différenciation modérée des LB naïfs afin de contrôler le niveau d'inflammation de l'intestin.

Dans les maladies neurologiques non inflammatoires, des LT CD4 exprimant l'intégrine  $\beta$ 7 et CCR9 ont été détectés dans le LCR des patients, montrant ainsi que les LT intestinaux sont capables de migrer dans le SNC chez l'Homme<sup>442</sup>. En outre, de nombreuses études ont révélé l'impact du microbiote intestinal sur le développement de l'EAE via notamment la promotion de LT intestinaux inflammatoires. Dans notre modèle de la BHE, nous avons pu constater que les Th et les TFh int $\beta$ 7<sup>+</sup> étaient capables de migrer, via leur expression de l'intégrine  $\beta$ 2 et  $\beta$ 1 à travers la monocouche de cellules endothéliales. De façon intéressante, nous avons observé une migration supérieure des Th1/17 et TFh1/17 exprimant ou non l'intégrine  $\beta$ 7, comparés aux autres sous-populations de Th et TFh. Nous avons pu observer que l'ensemble des sous-populations de TFh exprimant l'intégrine  $\beta$ 7 migrent de façon équivalente aux sous-populations de TFh int $\beta$ 7<sup>-</sup>. En revanche, nous avons pu constater que la migration des Th1, Th2 et Th17 int $\beta$ 7<sup>+</sup>int $\beta$ 1<sup>low</sup> est inférieure à celle des sous-populations de Th int $\beta$ 1<sup>+</sup> $\beta$ 7<sup>-</sup>. Cette différence de migration n'est pas observée entre les Th1/17 int $\beta$ 7<sup>+</sup>int $\beta$ 1<sup>low</sup> et les Th1/17 int $\beta$ 1<sup>+</sup> $\beta$ 7<sup>-</sup>. Nos résultats montrent que, dans le compartiment int $\beta$ 7<sup>+</sup>, la migration des Th1/17 est supérieure à celle des autres sous-populations. De plus, seuls les Th1/17 int $\beta$ 7<sup>+</sup> migrent de façon équivalente aux Th1/17 int $\beta$ 7<sup>-</sup>, et pourraient donc plus facilement participer à l'inflammation du SNC. De nombreuses études ont décrit l'implication des Th1/17 dans l'inflammation observée chez les patients SEP, avec notamment la présence de cellules co-exprimant l'IL-17A et l'IFN $\gamma$  spécifiques des protéines de la myéline en périphérie<sup>307</sup>, ainsi que leur présence dans les tissus cérébraux de patients SEP<sup>470</sup>. La capacité d'aide des TFh1/17 n'étant pas encore bien décrite, mais au vu de leur facilité à traverser notre modèle de la BHE, il serait intéressant de voir si leur fonction est impactée dans la SEP. Dans un autre modèle de migration *in vitro*, utilisant une lignée de cellules endothéliales différentes, les BLECs (brain lymphatic endothelial cells), il a été montré que, sans stimulation, les Th1 et les Th1/17 migrent préférentiellement à travers la monocouche de cellules endothéliales. En revanche, l'ensemble des sous-populations (Th1, Th2, Th17 et Th1/17) migrent de façon similaire lorsque les cellules endothéliales sont stimulées avec du TNF $\alpha$  et de l'IFN $\gamma$ , ce qui est cohérent avec nos résultats. En outre, dans cette étude, les auteurs ont montré que le pourcentage de migration des Th17 et Th1/17, provenant de LCR de patients en phase RRMS, à travers les cellules épithéliales du plexus choroïde, est supérieur à celui des autres sous-populations. Concernant la migration des Th provenant du LCR de patients à travers leur modèle de

BHE, l'ensemble des sous-population de Th est capable de migrer, avec une migration préférentielle des Th17, dans les conditions non stimulés uniquement<sup>471</sup>. Il serait donc intéressant d'évaluer la migration des Th, et particulièrement des TFh, exprimant l'intégrine  $\beta 7$ , à travers un modèle de cellules épithéliales du plexus choroïde afin de voir si les LT intestinaux migrent préférentiellement via la BHE ou le plexus choroïde. De plus, il serait également intéressant d'étudier la migration des TFh int $\beta 7^+$ , particulièrement les TFh1/17, ainsi que celle des Th1/17 int $\beta 7^+$ , en utilisant des PBMC de patients en phase RRMS, SPMS et PPMS.

La découverte des eGC dans les méninges de 40% des patients en phase SPMS, ainsi que la présence de CXCL13 dans le LCR des patients RRMS présentant des lésions corticales suggèrent l'implication des TFh dans le développement de la SEP<sup>361 226</sup>. Il a notamment été montré une augmentation de la proportion des TFh ICOS<sup>+</sup> dans les phases RRMS et SPMS comparés aux donneurs sains, qui est corrélée avec la progression de la maladie chez les patients SPMS<sup>472</sup>. Dans notre étude, nous avons également observé une augmentation de la proportion de TFh dans la phase SPMS mais spécifiquement dans le compartiment int $\beta 7^+$ , comparée aux donneurs sains. Ces résultats suggèrent que les TFh sont altérés particulièrement en phase SPMS, ce qui est cohérent avec les données de la littérature sur la présence d'eGC prédominante dans cette phase. Au départ considérée comme une spécificité de la phase SPMS, des études ont montré la présence d'eGC et d'agrégats dans les méninges de patients en phase RRMS, particulièrement agressive avec une durée moyenne de la maladie de 2 ans seulement<sup>361</sup>. Toutefois, quelle que soit la phase, la présence de ces structures est corrélée avec la gravité de la maladie. Il a été notamment suggéré que la présence d'eGC constitue le stade final de l'inflammation dans le SNC. Nous avons de plus constaté une modification de la proportion des sous-types de TFh en phase SPMS, avec une diminution des TFh1, définis comme n'étant pas efficaces dans l'aide des LB, et une augmentation de sous-type aidant les LB (TFh17), à la fois dans le compartiment int $\beta 7^+$  et int $\beta 7^-$ , supportant que les TFh seraient davantage impliqués dans les phases progressives de la maladie. En effet, dans les MAI, il a été décrit un déséquilibre des sous-types de TFh en faveur des phénotypes capables d'aider les LB (TFh2 et TFh17), qui corrèle avec l'activité de la maladie.

Par ailleurs, la fonction des TFh dans la différenciation des LB de patients SEP, *in vitro*, n'ayant pas été encore étudiée, nous avons réalisé des co-cultures avec des TFh provenant de patients RRMS, SPMS et PPMS. Nous avons pu constater que les TFh int $\beta 7^+$  et int $\beta 7^-$  de patients SPMS induisent une différenciation en plasmocytes et en sécrétion d'IgG et IgA supérieure aux TFh de donneurs sains. De plus, les TFh int $\beta 7^+$  de patients SPMS induisent une différenciation des LB équivalente à celle des TFh int $\beta 7^-$  de donneurs sains. Le fait que les TFh int $\beta 7^+$  soient plus fonctionnels en phase SPMS peut indiquer une potentielle pathogénicité de ces cellules, via la génération de LB pathogéniques par mimétisme moléculaire, qui pourraient participer au développement des eGC. En effet, il a été montré

qu'il existe des similarités entre les séquences d'acide aminés de bactéries intestinales avec les peptides neuronaux<sup>473</sup>. Les TFh int $\beta$ 7+ pourraient donc participer à l'activation de LB reconnaissant un peptide bactérien ayant des similarités avec les peptides de la myéline. A l'inverse de ce que nous observons en phase SPMS, les TFh int $\beta$ 7- et int $\beta$ 7+ de patients RRMS et PPMS ont une aide similaire aux donneurs sains. Nous ne pouvons cependant pas exclure l'effet des traitements sur l'étude fonctionnelle des TFh, en particulier concernant les patients en phase PPMS. Cependant, pour limiter l'impact des traitements sur nos résultats, nous avons utilisé des patients de phases différentes ayant le même traitement, ainsi que quelques patients non traités. De plus, les patients sélectionnés ont un traitement injectable (sous cutanée ou intramusculaire), limitant ainsi un éventuel impact sur le microbiote intestinal, sauf pour le méthotrexate qui peut être pris par voie orale. Toutefois, il est à noter que la différenciation des LB naïfs ainsi que la sécrétion d'Ig induite par les TFh int $\beta$ 7- de patients en phase RRMS et PPMS sont similaires à celles des TFh int $\beta$ 7- de donneurs sains suggérant que les traitements impactent peu nos expériences. Afin de poursuivre l'étude des TFh int $\beta$ 7+, il serait envisageable de comparer la clonalité des TCR des PBMC provenant du sang et du LCR des patients permettant ainsi d'étudier la présence ou non de clones spécifiques de LT CD4 intestinaux dans le SNC de patients en phase RRMS et PPMS. Le prélèvement de LCR n'étant pas réalisé chez les patients SPMS, il serait possible de faire une étude transcriptomique des TFh int $\beta$ 7- et int $\beta$ 7+ des patients en phase SPMS comparés à des donneurs sains afin d'évaluer la différence de profil d'expression génique qui pourrait expliquer l'augmentation de leur fonction observée dans nos expériences. De plus, une étude a montré que, selon le modèle EAE utilisé, associé à la phase chronique de la maladie ou la phase récurrente rémittente, les TFh peuvent avoir un rôle différent au cours de la neuro-inflammation. En effet, il a été montré une augmentation de la fréquence des TFh dans le SNC, durant le pic d'EAE chez les souris présentant une EAE chronique, ainsi que pendant les phases de rémission chez les souris avec une EAE récurrente rémittente<sup>474</sup>. Les auteurs ont également pu constater une plus forte proportion de TFh au niveau de la dure-mère des méninges des souris, à la fois chronique et récurrente rémittente. L'augmentation de la proportion des TFh aidants dans le compartiment int $\beta$ 7+, ainsi que l'augmentation de leur fonction, dans la phase SPMS pourraient être corrélées avec la présence d'eGC dans les méninges et/ou avec l'inflammation méningée observée chez les patients SPMS. Nos résultats supportent l'implication des TFh, et plus particulièrement ceux dérivant de l'intestin, chez les patients en phase SPMS. Les TFh int $\beta$ 7+ pourraient également participer à la physiopathologie des autres phases en soutenant l'induction de plasmocytes sécréteurs d'IgA au niveau de l'intestin ou directement dans le SNC. En effet, il a été montré que le niveau d'IgA dans le LCR des patients durant les phases actives de RRMS est supérieur à celui des donneurs sains et des patients atteints de maladie neurodégénérative, et est associé à une augmentation dans le sang de plasmocytes sécréteurs d'IgA spécifiques de bactéries commensales ainsi qu'à l'activité de la maladie. Dans cette étude, la majorité des plasmocytes IgA+ au niveau du SNC de patients RRMS exprime le gène codant pour l'intégrine  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 suggérant leur origine intestinale, d'autant plus que certains clones

de plasmocytes IgA+, retrouvés dans le LCR, sont spécifiques d'antigènes de bactéries intestinales<sup>475</sup>. Le séquençage du BCR des LB présents dans le sang et le LCR des patients SEP a montré que des clones de LB IgA+ sont présents à la fois dans le sang et le LCR, suggérant la migration des LB IgA+ de la périphérie au SNC durant les phases inflammatoires<sup>475</sup>. Dans un modèle EAE, il a été observé un effet protecteur contre la neuro-inflammation du SNC par les plasmocytes sécréteurs d'IgA d'origine intestinale, notamment via leur sécrétion d'IL-10<sup>450</sup>. Il est donc également possible que les TFh intβ7+ soient impliqués dans la génération de plasmocytes sécréteurs d'IgA participant à la suppression de l'inflammation. Nous n'avons pas observé une augmentation de l'activité des TFh intβ7+ de patients RRMS, dans nos co-cultures, mais il serait intéressant d'explorer la fonctionnalité des TFh intβ7+ chez les patients RRMS en phase aiguë. La phase RRMS est une phase évolutive, la mise en place des eGC observés chez les patients SPMS peut potentiellement débiter dans cette phase et être la résultante de la dérégulation prolongée du système immunitaire, et particulièrement des TFh.

L'ensemble de nos résultats montrent que les TFh intestinaux sont impactés dans la SEP, particulièrement dans les phases progressives, et pourraient être impliqués dans l'inflammation méningée et la formation des eGC en phase SPMS, mais également dans la formation des lésions corticales qui sont corrélées avec le niveau de CXCL13 dans le LCR des patients RRMS<sup>361</sup>.



## Conclusion générale

Notre étude apporte de nouvelles connaissances sur les Th et TFh dérivant de l'intestin, en montrant qu'ils ont des propriétés différentes des LT CD4 non intestinaux chez les sujets sains. L'impact du microbiote intestinal, à la fois en conditions physiologique et pathologique, sur les lymphocytes intestinaux ainsi que l'impact de ces lymphocytes intestinaux dans le développement de pathologies chez l'Homme n'est pas encore bien décrit. Toutefois, de plus en plus d'études s'intéressent au microbiote intestinal et aux cellules du SI au contact de celui-ci, permettant d'ouvrir d'autres possibilités d'étude dans le développement de maladies, associées à une dysbiose. Dans le contexte de la SEP, une meilleure caractérisation des LT intestinaux, dont les TFh, pourrait permettre de mieux comprendre l'impact du microbiote sur le développement de cette maladie, et ainsi constituer un potentiel biomarqueur de l'évolution de la SEP. Nous avons en outre mis en évidence une dérégulation spécifique des LT CD4 int $\beta$ 7+ chez les patients sous Natalizumab en phase RRMS. Le Natalizumab, un anticorps monoclonal anti-intégrine  $\alpha$ 4, bloquant la migration des lymphocytes au niveau du SNC, entraîne une augmentation de la proportion de Th1/17 ainsi que celle des LT CD4 mémoires co-exprimant l'IL-17 et le GM-CSF spécifiquement dans le compartiment int $\beta$ 7 suggérant que ces LT CD4 int $\beta$ 7+ pourraient être impliqués dans la réactivation de la maladie observée chez 20% des patients RRMS, après l'arrêt du traitement. Dans le cas des TFh int $\beta$ 7+, la compréhension des mécanismes impliqués dans l'aide plus faible apportée aux LB, chez les sujets sains, pourrait permettre de mieux comprendre l'augmentation de leur fonction observée chez les patients SPMS. Nos résultats indiquent donc que les propriétés des LT intestinaux sont impactées dans la SEP, ce qui suggère leur implication dans le développement de cette maladie.

Il serait intéressant de mieux caractériser les patients atteints de SEP en prenant en compte la modification du microbiote intestinal afin de pouvoir mieux adapter les stratégies thérapeutiques. Plus généralement, les TFh intestinaux pourraient être impliqués dans d'autres MAI présentant notamment des eGC ainsi qu'une altération de la composition du microbiote intestinal.

## Bibliographie

1. Tokoyoda, K., Egawa, T., Sugiyama, T., Choi, B.-I. & Nagasawa, T. Cellular Niches Controlling B Lymphocyte Behavior within Bone Marrow during Development. *Immunity* **20**, 707–718 (2004).
2. Melchers, F. Checkpoints that control B cell development. *Journal of Clinical Investigation* **125**, 2203–2210 (2015).
3. Nagasawa, T. Microenvironmental niches in the bone marrow required for B-cell development. *Nature Reviews Immunology* **6**, 107–116 (2006).
4. Kaminski, D. A., Wei, C., Qian, Y., Rosenberg, A. F. & Sanz, I. Advances in Human B Cell Phenotypic Profiling. *Frontiers in Immunology* **3**, (2012).
5. B Cell Development, Activation and Effector Functions. in *Primer to the Immune Response* 111–142 (Elsevier, 2014). doi:10.1016/B978-0-12-385245-8.00005-4.
6. Noviski, M. *et al.* IgM and IgD B cell receptors differentially respond to endogenous antigens and control B cell fate. *eLife* **7**, (2018).
7. Hernandez, J. B., Newton, R. H. & Walsh, C. M. Life and death in the thymus—cell death signaling during T cell development. *Current Opinion in Cell Biology* **22**, 865–871 (2010).
8. Tourigny, M. R., Mazel, S., Burtrum, D. B. & Petrie, H. T. T Cell Receptor (TCR)- $\alpha$  Gene Recombination: Dissociation from Cell Cycle Regulation and Developmental Progression During T Cell Ontogeny. **8**.
9. Kappes, D. J., He, X. & He, X. CD4-CD8 lineage commitment: an inside view. *Nature Immunology* **6**, 761–766 (2005).
10. Elmore, S. A. Enhanced Histopathology of Mucosa-Associated Lymphoid Tissue. *Toxicologic Pathology* **34**, 687–696 (2006).
11. Burrell, B. E. *et al.* Tolerance and Lymphoid Organ Structure and Function. *Frontiers in Immunology* **2**, (2011).
12. Knoop, K. A. & Newberry, R. D. Isolated Lymphoid Follicles are Dynamic Reservoirs for the Induction of Intestinal IgA. *Frontiers in Immunology* **3**, (2012).
13. Berkowska, M. A. *et al.* Human memory B cells originate from three distinct germinal center-dependent and -independent maturation pathways. *Blood* **118**, 2150–2158 (2011).
14. Heesters, B. A., van der Poel, C. E., Das, A. & Carroll, M. C. Antigen Presentation to B Cells. *Trends in Immunology* **37**, 844–854 (2016).
15. Maul, R. W. & Gearhart, P. J. AID and Somatic Hypermutation. in *Advances in Immunology* vol. 105 159–191 (Elsevier, 2010).
16. De Silva, N. S. & Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews Immunology* **15**, 137–148 (2015).
17. O'Connor, B. P., Cascalho, M. & Noelle, R. J. Short-lived and Long-lived Bone Marrow Plasma Cells Are Derived from a Novel Precursor Population. *Journal of Experimental Medicine* **195**, 737–745 (2002).
18. Jourdan, M. *et al.* Characterization of a Transitional Preplasmablast Population in the Process of Human B Cell to Plasma Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* **187**, 3931–3941 (2011).
19. Halliley, J. L. *et al.* Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19–CD38hiCD138+ Subset in Human Bone Marrow. *Immunity* **43**, 132–145 (2015).
20. Brynjolfsson, S. F., Mohaddes, M., Kärholm, J. & Wick, M.-J. Long-lived plasma cells in human bone marrow can be either CD19+ or CD19–. *Blood Advances* **1**, 835–838 (2017).
21. Caraux, A. *et al.* Circulating human B and plasma cells. Age-associated changes in counts and detailed characterization of circulating normal CD138– and CD138+ plasma cells. *Haematologica* **95**, 1016–1020 (2010).
22. Jourdan, M. *et al.* An in vitro model of differentiation of memory B cells into plasmablasts and plasma cells including detailed phenotypic and molecular characterization. **114**, 9 (2009).
23. Medina, F., Segundo, C., Campos-Caro, A., González-García, I. & Brieva, J. A. The heterogeneity shown by human plasma cells from tonsil, blood, and bone marrow reveals graded stages of increasing maturity, but local profiles of adhesion molecule expression. *Blood* **99**, 2154–2161 (2002).
24. Liew, P. X. The Longevity of the Humoral Immune Response: Survival of Long-lived Plasma Cells. **10** (2012).
25. Forthall, D. N. Functions of Antibodies. (2014).

26. Cambier, J. C., Gauld, S. B., Merrell, K. T. & Vilen, B. J. B-cell anergy: from transgenic models to naturally occurring anergic B cells? *Nature Reviews Immunology* **7**, 633–643 (2007).
27. Ehrenstein, M. R. & Notley, C. A. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nature Reviews Immunology* **10**, 778–786 (2010).
28. Schroeder, H. W. & Cavacini, L. Structure and function of immunoglobulins. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **125**, S41–S52 (2010).
29. Oettgen, H. C. Fifty years later: Emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases. *Journal of Allergy and Clinical Immunology* **137**, 1631–1645 (2016).
30. Allman, D., Wilmore, J. R. & Gaudette, B. T. The continuing story of T-cell independent antibodies. *Immunological Reviews* **288**, 128–135 (2019).
31. Taillardet, M. *et al.* The thymus-independent immunity conferred by a pneumococcal polysaccharide is mediated by long-lived plasma cells. *Blood* **114**, 4432–4440 (2009).
32. B-cell activation by T-cell-independent type 2 antigens as an integral part of the humoral immune response to pathogenic microorganisms. *Immunological Reviews* **176**, 154–170 (2000).
33. Luckheeram, R. V., Zhou, R., Verma, A. D. & Xia, B. CD4<sup>+</sup> T Cells: Differentiation and Functions. *Clinical and Developmental Immunology* **2012**, 1–12 (2012).
34. Rossol, S. *et al.* Interleukin-12 induction of Th1 cytokines is important for viral clearance in chronic hepatitis B. *Journal of Clinical Investigation* **99**, 3025–3033 (1997).
35. Geginat, J. *et al.* Plasticity of Human CD4 T Cell Subsets. *Frontiers in Immunology* **5**, (2014).
36. Kaplan, M. H., Schindler, U., Smiley, S. T. & Grusby, M. J. Stat6 Is Required for Mediating Responses to IL-4 and for the Development of Th2 Cells. *Immunity* **4**, 313–319 (1996).
37. Zhu, J., Yamane, H., Cote-Sierra, J., Guo, L. & Paul, W. E. GATA-3 promotes Th2 responses through three different mechanisms: induction of Th2 cytokine production, selective growth of Th2 cells and inhibition of Th1 cell-specific factors. *Cell Research* **16**, 3–10 (2006).
38. Aujla, S. J. *et al.* IL-22 mediates mucosal host defense against Gram-negative bacterial pneumonia. *Nature Medicine* **14**, 275–281 (2008).
39. Korn, T. *et al.* IL-21 initiates an alternative pathway to induce proinflammatory TH17 cells. *Nature* **448**, 484–487 (2007).
40. Leonard, W. J. & Spolski, R. Interleukin-21: a modulator of lymphoid proliferation, apoptosis and differentiation. *Nature Reviews Immunology* **5**, 688–698 (2005).
41. Schmitt, N. & Ueno, H. Regulation of human helper T cell subset differentiation by cytokines. *Current Opinion in Immunology* **34**, 130–136 (2015).
42. Volpe, E. *et al.* A critical function for transforming growth factor- $\beta$ , interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human TH-17 responses. *Nature Immunology* **9**, 650–657 (2008).
43. Yang, X. O. *et al.* STAT3 Regulates Cytokine-mediated Generation of Inflammatory Helper T Cells. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 9358–9363 (2007).
44. Zhang, F., Meng, G. & Strober, W. Interactions among the transcription factors Runx1, ROR $\gamma$ t and Foxp3 regulate the differentiation of interleukin 17–producing T cells. *Nature Immunology* **9**, 1297–1306 (2008).
45. Kaplan, M. H. Th9 cells: differentiation and disease. *Immunological Reviews* **252**, 104–115 (2013).
46. Liudahl, S. M. & Coussens, L. M. To Help or To Harm. in *Immunology* 97–116 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-809819-6.00008-3.
47. Olson, B. M., Sullivan, J. A. & Burlingham, W. J. Interleukin 35: A Key Mediator of Suppression and the Propagation of Infectious Tolerance. *Frontiers in Immunology* **4**, (2013).
48. Wing, J. B., Ise, W., Kurosaki, T. & Sakaguchi, S. Regulatory T Cells Control Antigen-Specific Expansion of Tfh Cell Number and Humoral Immune Responses via the Coreceptor CTLA-4. *Immunity* **41**, 1013–1025 (2014).
49. Nemazee, D. Mechanisms of central tolerance for B cells. *Nature Reviews Immunology* **17**, 281–294 (2017).
50. Xing, Y. & Hogquist, K. A. T-Cell Tolerance: Central and Peripheral. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **4**, a006957–a006957 (2012).
51. Mueller, D. L. Mechanisms maintaining peripheral tolerance. *Nature Immunology* **11**, 21–27 (2010).
52. Miller, J. F. & Mitchell, G. F. Cell to Cell Interaction in the Immune Response. I. Hemolysin-forming Cells in Neonatally Thymectomized Mice Reconstituted With Thymus or Thoracic Duct Lymphocytes. *Journal of Experimental Medicine* **128**, 801–820 (1968).

53. Katz, D. H. & Benacerraf, B. The Regulatory Influence of Activated T Cells on B Cell Responses to Antigen. in *Advances in Immunology* vol. 15 1–94 (Elsevier, 1972).
54. Kopf, M. *et al.* Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses. **362**, 4 (1993).
55. Clark, E. A. Activation of human B cells mediated through two distinct cell surface differentiation antigens, Bp35 and Bp50. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **5** (1986).
56. Farrington, M., Hollenbaugh, D. & Li, X. The CD40 Ligand, gp39, Is Defective in Activated T Cells from Patients with X-Linked Hyper-IgM Syndrome. 10.
57. Foy, T. M. *et al.* gp39-CD40 Interactions Are Essential for Germinal Center Formation and the Development of B Cell Memory. *Journal of Experimental Medicine* **180**, 157–163 (1994).
58. Okada, T. *et al.* Antigen-Engaged B Cells Undergo Chemotaxis toward the T Zone and Form Motile Conjugates with Helper T Cells. *PLoS Biology* **3**, e150 (2005).
59. Kaiser, E. *et al.* The G protein-coupled receptor BLR1 is involved in murine B cell differentiation and is also expressed in neuronal tissues. *European Journal of Immunology* **23**, 2532–2539 (1993).
60. Förster, R. *et al.* A Putative Chemokine Receptor, BLR1, Directs B Cell Migration to Defined Lymphoid Organs and Specific Anatomic Compartments of the Spleen. *Cell* **87**, 1037–1047 (1996).
61. Legler, D. F. *et al.* B Cell-attracting Chemokine 1, a Human CXC Chemokine Expressed in Lymphoid Tissues, Selectively Attracts B Lymphocytes via BLR1/CXCR5. *Journal of Experimental Medicine* **187**, 655–660 (1998).
62. Ettinger, R. *et al.* IL-21 Induces Differentiation of Human Naive and Memory B Cells into Antibody-Secreting Plasma Cells. *The Journal of Immunology* **175**, 7867–7879 (2005).
63. McAdam, A. J. *et al.* ICOS is critical for CD40-mediated antibody class switching. *Nature* **409**, 102–105 (2001).
64. Ma, C. S. & Deenick, E. K. Human T follicular helper (T<sub>fh</sub>) cells and disease. *Immunology & Cell Biology* **92**, 64–71 (2014).
65. Crotty, S., Kersh, E. N., Cannons, J., Schwartzberg, P. L. & Ahmed, R. SAP is required for generating long-term humoral immunity. *Nature* **421**, 282–287 (2003).
66. Nurieva, R. I. *et al.* Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. *Science* **325**, 1001–1005 (2009).
67. Yu, D. *et al.* The Transcriptional Repressor Bcl-6 Directs T Follicular Helper Cell Lineage Commitment. *Immunity* **31**, 457–468 (2009).
68. Johnston, R. J. *et al.* Bcl6 and Blimp-1 Are Reciprocal and Antagonistic Regulators of T Follicular Helper Cell Differentiation. *Science* **325**, 1006–1010 (2009).
69. Wei, L., Laurence, A., Elias, K. M. & O’Shea, J. J. IL-21 Is Produced by Th17 Cells and Drives IL-17 Production in a STAT3-dependent Manner. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 34605–34610 (2007).
70. Ma, C. S., Deenick, E. K., Batten, M. & Tangye, S. G. The origins, function, and regulation of T follicular helper cells. *The Journal of Experimental Medicine* **209**, 1241–1253 (2012).
71. Link, A. *et al.* Fibroblastic reticular cells in lymph nodes regulate the homeostasis of naive T cells. *Nature Immunology* **8**, 1255–1265 (2007).
72. Fazilleau, N., McHeyzer-Williams, L. J., Rosen, H. & McHeyzer-Williams, M. G. The function of follicular helper T cells is regulated by the strength of T cell antigen receptor binding. *Nature Immunology* **10**, 375–384 (2009).
73. Tubo, N. J. *et al.* Single Naive CD4<sup>+</sup> T Cells from a Diverse Repertoire Produce Different Effector Cell Types during Infection. *Cell* **153**, 785–796 (2013).
74. Man, K. *et al.* The transcription factor IRF4 is essential for TCR affinity-mediated metabolic programming and clonal expansion of T cells. *Nature Immunology* **14**, 1155–1165 (2013).
75. Krishnamoorthy, V. *et al.* The IRF4 Gene Regulatory Module Functions as a Read-Write Integrator to Dynamically Coordinate T Helper Cell Fate. *Immunity* **47**, 481–497.e7 (2017).
76. Linterman, M. A. *et al.* CD28 expression is required after T cell priming for helper T cell responses and protective immunity to infection. *eLife* **3**, (2014).
77. Webb, L. M. C. & Linterman, M. A. Signals that drive T follicular helper cell formation. *Immunology* **152**, 185–194 (2017).
78. Choi, Y. S., Eto, D., Yang, J. A., Lao, C. & Crotty, S. Cutting Edge: STAT1 Is Required for IL-6-Mediated Bcl6 Induction for Early Follicular Helper Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* **190**, 3049–3053 (2013).
79. Ballesteros-Tato, A. *et al.* Interleukin-2 Inhibits Germinal Center Formation by Limiting T Follicular Helper Cell Differentiation. *Immunity* **36**, 847–856 (2012).

80. Nurieva, R. I. *et al.* STAT5 Protein Negatively Regulates T Follicular Helper (Tfh) Cell Generation and Function. *Journal of Biological Chemistry* **287**, 11234–11239 (2012).
81. Johnston, R. J., Choi, Y. S., Diamond, J. A., Yang, J. A. & Crotty, S. STAT5 is a potent negative regulator of TFH cell differentiation. *The Journal of Experimental Medicine* **209**, 243–250 (2012).
82. Yang, Y., Ochando, J., Yopp, A., Bromberg, J. S. & Ding, Y. IL-6 Plays a Unique Role in Initiating c-Maf Expression during Early Stage of CD4 T Cell Activation. *The Journal of Immunology* **174**, 2720–2729 (2005).
83. Andris, F. *et al.* The Transcription Factor c-Maf Promotes the Differentiation of Follicular Helper T Cells. *Frontiers in Immunology* **8**, (2017).
84. Dienz, O. & Rincon, M. The effects of IL-6 on CD4 T cell responses. *Clinical Immunology* **130**, 27–33 (2009).
85. Gringhuis, S. I. *et al.* Fucose-based PAMPs prime dendritic cells for follicular T helper cell polarization via DC-SIGN-dependent IL-27 production. *Nature Communications* **5**, (2014).
86. Batten, M. *et al.* IL-27 supports germinal center function by enhancing IL-21 production and the function of T follicular helper cells. *The Journal of Experimental Medicine* **207**, 2895–2906 (2010).
87. Nurieva, R. I. *et al.* Generation of T Follicular Helper Cells Is Mediated by Interleukin-21 but Independent of T Helper 1, 2, or 17 Cell Lineages. *Immunity* **29**, 138–149 (2008).
88. Vogelzang, A. *et al.* A Fundamental Role for Interleukin-21 in the Generation of T Follicular Helper Cells. *Immunity* **29**, 127–137 (2008).
89. Schmitt, N. *et al.* The cytokine TGF- $\beta$  co-opts signaling via STAT3-STAT4 to promote the differentiation of human TFH cells. *Nature Immunology* **15**, 856–865 (2014).
90. Schmitt, N. *et al.* IL-12 receptor b1 deficiency alters in vivo T follicular helper cell response in humans. **121**, 12 (2013).
91. Nakayama, S. *et al.* Early Th1 Cell Differentiation Is Marked by a Tfh Cell-like Transition. *Immunity* **35**, 919–931 (2011).
92. Hiramatsu, Y. *et al.* c-Maf activates the promoter and enhancer of the IL-21 gene, and TGF- $\beta$  inhibits c-Maf-induced IL-21 production in CD4<sup>+</sup> T cells. *Journal of Leukocyte Biology* **87**, 703–712 (2010).
93. Locci, M. *et al.* Activin A programs the differentiation of human TFH cells. *Nature Immunology* **17**, 976–984 (2016).
94. Deenick, E. K. *et al.* Follicular Helper T Cell Differentiation Requires Continuous Antigen Presentation that Is Independent of Unique B Cell Signaling. *Immunity* **33**, 241–253 (2010).
95. Cosgrove, J. *et al.* B cell zone reticular cell microenvironments shape CXCL13 gradient formation. *Nature Communications* **11**, (2020).
96. Haynes, N. M. *et al.* Role of CXCR5 and CCR7 in Follicular Th Cell Positioning and Appearance of a Programmed Cell Death Gene-1<sup>High</sup> Germinal Center-Associated Subpopulation. *The Journal of Immunology* **179**, 5099–5108 (2007).
97. Ansel, K. M., McHeyzer-Williams, L. J., Ngo, V. N., McHeyzer-Williams, M. G. & Cyster, J. G. In Vivo-Activated Cd4 T Cells Upregulate Cxc Chemokine Receptor 5 and Reprogram Their Response to Lymphoid Chemokines. *Journal of Experimental Medicine* **190**, 1123–1134 (1999).
98. Poholek, A. C. *et al.* In Vivo Regulation of Bcl6 and T Follicular Helper Cell Development. *The Journal of Immunology* **185**, 313–326 (2010).
99. Ley, K. & Kansas, G. S. Selectins in T-cell recruitment to non-lymphoid tissues and sites of inflammation. *Nature Reviews Immunology* **4**, 325–336 (2004).
100. Mesin, L., Ersching, J. & Victora, G. D. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* **45**, 471–482 (2016).
101. Heesters, B. A. *et al.* Endocytosis and Recycling of Immune Complexes by Follicular Dendritic Cells Enhances B Cell Antigen Binding and Activation. *Immunity* **38**, 1164–1175 (2013).
102. Reif, K. *et al.* Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position. *Nature* **416**, 94–99 (2002).
103. Schwickert, T. A. *et al.* A dynamic T cell-limited checkpoint regulates affinity-dependent B cell entry into the germinal center. *Journal of Experimental Medicine* **208**, 1243–1252 (2011).
104. Yeh, C.-H., Nojima, T., Kuraoka, M. & Kelsoe, G. Germinal center entry not selection of B cells is controlled by peptide-MHCII complex density. *Nature Communications* **9**, (2018).
105. Kelly, L. M., Pereira, J. P., Yi, T., Xu, Y. & Cyster, J. G. EBI2 Guides Serial Movements of Activated B Cells and Ligand Activity Is Detectable in Lymphoid and Nonlymphoid Tissues. *The Journal of Immunology* **187**, 3026–3032 (2011).
106. Gatto, D. & Brink, R. B cell localization: regulation by EBI2 and its oxysterol ligand. *Trends in*

- Immunology* **34**, 336–341 (2013).
107. Suan, D. *et al.* T Follicular Helper Cells Have Distinct Modes of Migration and Molecular Signatures in Naive and Memory Immune Responses. *Immunity* **42**, 704–718 (2015).
  108. Yi, T. *et al.* Oxysterol Gradient Generation by Lymphoid Stromal Cells Guides Activated B Cell Movement during Humoral Responses. *Immunity* **37**, 535–548 (2012).
  109. Liu, C. *et al.* Oxysterols direct B-cell migration through EBI2. *Nature* **475**, 519–523 (2011).
  110. Kitano, M. *et al.* Bcl6 Protein Expression Shapes Pre-Germinal Center B Cell Dynamics and Follicular Helper T Cell Heterogeneity. *Immunity* **34**, 961–972 (2011).
  111. Baumjohann, D., Okada, T. & Ansel, K. M. Cutting Edge: Distinct Waves of BCL6 Expression during T Follicular Helper Cell Development. *The Journal of Immunology* **187**, 2089–2092 (2011).
  112. Song, W. & Craft, J. T follicular helper cell heterogeneity: Time, space, and function. *Immunological Reviews* **288**, 85–96 (2019).
  113. Moriyama, S. *et al.* Sphingosine-1-phosphate receptor 2 is critical for follicular helper T cell retention in germinal centers. *The Journal of Experimental Medicine* **211**, 1297–1305 (2014).
  114. Green, J. A. *et al.* The sphingosine 1-phosphate receptor S1P2 maintains the homeostasis of germinal center B cells and promotes niche confinement. *Nature Immunology* **12**, 672–680 (2011).
  115. Pereira, J. P., Kelly, L. M., Xu, Y. & Cyster, J. G. EBI2 mediates B cell segregation between the outer and centre follicle. *Nature* **460**, 1122–1126 (2009).
  116. Rasheed, A.-U., Rahn, H.-P., Sallusto, F., Lipp, M. & Müller, G. Follicular B helper T cell activity is confined to CXCR5hiICOShi CD4 T cells and is independent of CD57 expression. *European Journal of Immunology* **36**, 1892–1903 (2006).
  117. Estes, J. D. *et al.* Follicular Dendritic Cell-Mediated Up-Regulation of CXCR4 Expression on CD4 T Cells and HIV Pathogenesis. *The Journal of Immunology* **169**, 2313–2322 (2002).
  118. Allen, C. D. C. *et al.* Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5. *Nature Immunology* **5**, 943–952 (2004).
  119. Stewart, I., Radtke, D., Phillips, B., McGowan, S. J. & Bannard, O. Germinal Center B Cells Replace Their Antigen Receptors in Dark Zones and Fail Light Zone Entry when Immunoglobulin Gene Mutations are Damaging. *Immunity* **49**, 477–489.e7 (2018).
  120. De Silva, N. S. & Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nature Reviews Immunology* **15**, 137–148 (2015).
  121. Abbott, R. K. *et al.* Precursor Frequency and Affinity Determine B Cell Competitive Fitness in Germinal Centers, Tested with Germline-Targeting HIV Vaccine Immunogens. *Immunity* **48**, 133–146.e6 (2018).
  122. Gitlin, A. D., Shulman, Z. & Nussenzweig, M. C. Clonal selection in the germinal centre by regulated proliferation and hypermutation. *Nature* **509**, 637–640 (2014).
  123. Albagli-Curiel, O. Ambivalent role of BCL6 in cell survival and transformation. *Oncogene* **22**, 507–516 (2003).
  124. Reljic, R., Wagner, S. D., Peakman, L. J. & Fearon, D. T. Suppression of Signal Transducer and Activator of Transcription 3-Dependent B Lymphocyte Terminal Differentiation by Bcl-6. *Journal of Experimental Medicine* **192**, 1841–1848 (2000).
  125. Bryant, V. L. *et al.* Cytokine-Mediated Regulation of Human B Cell Differentiation into Ig-Secreting Cells: Predominant Role of IL-21 Produced by CXCR5<sup>+</sup> T Follicular Helper Cells. *The Journal of Immunology* **179**, 8180–8190 (2007).
  126. Laidlaw, B. J. *et al.* Interleukin-10 from CD4<sup>+</sup> follicular regulatory T cells promotes the germinal center response. *Science Immunology* **2**, eaan4767 (2017).
  127. Cunningham, A. F. *et al.* Pinpointing IL-4-independent acquisition and IL-4-influenced maintenance of Th2 activity by CD4 T cells. *European Journal of Immunology* **34**, 686–694 (2004).
  128. Moens, L. & Tangye, S. G. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Frontiers in Immunology* **5**, (2014).
  129. Casamayor-Palleja, M., Feuillard, J., Ball, J., Drew, M. & MacLennan, I. C. M. Centrocytes rapidly adopt a memory B cell phenotype on co-culture with autologous germinal centre T cell-enriched preparations. *International Immunology* **8**, 737–744 (1996).
  130. Oracki, S. A., Walker, J. A., Hibbs, M. L., Corcoran, L. M. & Tarlinton, D. M. Plasma cell development and survival: Plasma cell development and survival. *Immunological Reviews* **237**, 140–159 (2010).
  131. Crotty, S. Follicular Helper CD4 T Cells (T<sub>FH</sub>). *Annual Review of Immunology* **29**, 621–663 (2011).
  132. Di Yu *et al.* Roquin represses autoimmunity by limiting inducible T-cell co-stimulator messenger

- RNA. *Nature* **450**, 299–303 (2007).
133. Kroenke, M. A. *et al.* Bcl6 and Maf Cooperate To Instruct Human Follicular Helper CD4 T Cell Differentiation. *The Journal of Immunology* **188**, 3734–3744 (2012).
  134. Hatzi, K. *et al.* BCL6 orchestrates Tfh cell differentiation via multiple distinct mechanisms. *Journal of Experimental Medicine* **212**, 539–553 (2015).
  135. Kusam, S., Toney, L. M., Sato, H. & Dent, A. L. Inhibition of Th2 Differentiation and GATA-3 Expression by BCL-6. *The Journal of Immunology* **170**, 2435–2441 (2003).
  136. Bollig, N. *et al.* Transcription factor IRF4 determines germinal center formation through follicular T-helper cell differentiation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **109**, 8664–8669 (2012).
  137. Pham, D. *et al.* Batf Pioneers the Reorganization of Chromatin in Developing Effector T Cells via Ets1-Dependent Recruitment of Ctcf. *Cell Reports* **29**, 1203-1220.e7 (2019).
  138. Ise, W. *et al.* The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nature Immunology* **12**, 536–543 (2011).
  139. Bauquet, A. T. *et al.* The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nature Immunology* **10**, 167–175 (2009).
  140. Ise, W. *et al.* The transcription factor BATF controls the global regulators of class-switch recombination in both B cells and T cells. *Nature Immunology* **12**, 536–543 (2011).
  141. Kwon, H. *et al.* Analysis of Interleukin-21-Induced Prdm1 Gene Regulation Reveals Functional Cooperation of STAT3 and IRF4 Transcription Factors. *Immunity* **31**, 941–952 (2009).
  142. Gupta, S., Jiang, M., Anthony, A. & Pernis, A. B. Lineage-Specific Modulation of Interleukin 4 Signaling by Interferon Regulatory Factor 4. *The Journal of Experimental Medicine* **190**, 1837–1848 (1999).
  143. Sahoo, A. *et al.* Batf is important for IL-4 expression in T follicular helper cells. *Nature Communications* **6**, (2015).
  144. Li, B. Regulation of IL-4 expression by the transcription factor JunB during T helper cell differentiation. *The EMBO Journal* **18**, 420–432 (1999).
  145. Ho, I.-C., Hodge, M. R., Rooney, J. W. & Glimcher, L. H. The Proto-Oncogene c-maf Is Responsible for Tissue-Specific Expression of Interleukin-4. *Cell* **85**, 973–983 (1996).
  146. Martinez, G. J. *et al.* Cutting Edge: NFAT Transcription Factors Promote the Generation of Follicular Helper T Cells in Response to Acute Viral Infection. *The Journal of Immunology* **196**, 2015–2019 (2016).
  147. Bauquet, A. T. *et al.* The costimulatory molecule ICOS regulates the expression of c-Maf and IL-21 in the development of follicular T helper cells and TH-17 cells. *Nature Immunology* **10**, 167–175 (2009).
  148. Jubb, A. M. *et al.* Achaete-scute like 2 (ascl2) is a target of Wnt signalling and is upregulated in intestinal neoplasia. *Oncogene* **25**, 3445–3457 (2006).
  149. Liu, X. *et al.* Transcription factor achaete-scute homologue 2 initiates follicular T-helper-cell development. *Nature* **507**, 513–518 (2014).
  150. Kim, J. *et al.* Wnt5a Is Secreted by Follicular Dendritic Cells To Protect Germinal Center B Cells via Wnt/Ca<sup>2+</sup>/NFAT/NF-κB–B Cell Lymphoma 6 Signaling. *The Journal of Immunology* **188**, 182–189 (2012).
  151. Choi, Y. S. *et al.* LEF-1 and TCF-1 orchestrate TFH differentiation by regulating differentiation circuits upstream of the transcriptional repressor Bcl6. *Nature Immunology* **16**, 980–990 (2015).
  152. Lee, J.-Y. *et al.* The Transcription Factor KLF2 Restrains CD4 + T Follicular Helper Cell Differentiation. *Immunity* **42**, 252–264 (2015).
  153. Bai, A., Hu, H., Yeung, M. & Chen, J. Krüppel-Like Factor 2 Controls T Cell Trafficking by Activating L-Selectin (CD62L) and Sphingosine-1-Phosphate Receptor 1 Transcription. *The Journal of Immunology* **178**, 7632–7639 (2007).
  154. Stone, E. L. *et al.* ICOS Coreceptor Signaling Inactivates the Transcription Factor FOXO1 to Promote Tfh Cell Differentiation. *Immunity* **42**, 239–251 (2015).
  155. Matsuzaki, H., Daitoku, H., Hatta, M., Tanaka, K. & Fukamizu, A. Insulin-induced phosphorylation of FKHR (Foxo1) targets to proteasomal degradation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **100**, 11285–11290 (2003).
  156. Wang, H. *et al.* The transcription factor Foxp1 is a critical negative regulator of the differentiation of follicular helper T cells. *Nature Immunology* **15**, 667–675 (2014).

157. Yusuf, I. *et al.* Germinal Center T Follicular Helper Cell IL-4 Production Is Dependent on Signaling Lymphocytic Activation Molecule Receptor (CD150). *The Journal of Immunology* **185**, 190–202 (2010).
158. Qi, H., Cannons, J. L., Klauschen, F., Schwartzberg, P. L. & Germain, R. N. SAP-controlled T–B cell interactions underlie germinal centre formation. *Nature* **455**, 764–769 (2008).
159. Hu, J., Havenar-Daughton, C. & Crotty, S. Modulation of SAP dependent T:B cell interactions as a strategy to improve vaccination. *Current Opinion in Virology* **3**, 363–370 (2013).
160. Kageyama, R. *et al.* The Receptor Ly108 Functions as a SAP Adaptor-Dependent On-Off Switch for T Cell Help to B Cells and NKT Cell Development. *Immunity* **36**, 986–1002 (2012).
161. Cannons, J. L. *et al.* Optimal Germinal Center Responses Require a Multistage T Cell:B Cell Adhesion Process Involving Integrins, SLAM-Associated Protein, and CD84. *Immunity* **32**, 253–265 (2010).
162. Zhao, F., Cannons, J. L., Dutta, M., Griffiths, G. M. & Schwartzberg, P. L. Positive and Negative Signaling through SLAM Receptors Regulate Synapse Organization and Thresholds of Cytolysis. *Immunity* **36**, 1003–1016 (2012).
163. Weber, J. P. *et al.* ICOS maintains the T follicular helper cell phenotype by down-regulating Krüppel-like factor 2. *Journal of Experimental Medicine* **212**, 217–233 (2015).
164. Bossaller, L. *et al.* ICOS Deficiency Is Associated with a Severe Reduction of CXCR5<sup>+</sup> CD4 Germinal Center Th Cells. *The Journal of Immunology* **177**, 4927–4932 (2006).
165. Choi, Y. S. *et al.* ICOS Receptor Instructs T Follicular Helper Cell versus Effector Cell Differentiation via Induction of the Transcriptional Repressor Bcl6. *Immunity* **34**, 932–946 (2011).
166. Warnatz, K. Human ICOS deficiency abrogates the germinal center reaction and provides a monogenic model for common variable immunodeficiency. *Blood* **107**, 3045–3052 (2006).
167. Wikenheiser, D. J. & Stumhofer, J. S. ICOS Co-Stimulation: Friend or Foe? *Frontiers in Immunology* **7**, (2016).
168. Bolduc, A. *et al.* Constitutive CD40L Expression on B Cells Prematurely Terminates Germinal Center Response and Leads to Augmented Plasma Cell Production in T Cell Areas. *The Journal of Immunology* **185**, 220–230 (2010).
169. Allen, R. *et al.* CD40 ligand gene defects responsible for X-linked hyper-IgM syndrome. *Science* **259**, 990–993 (1993).
170. Butt, D. *et al.* FAS Inactivation Releases Unconventional Germinal Center B Cells that Escape Antigen Control and Drive IgE and Autoantibody Production. *Immunity* **42**, 890–902 (2015).
171. Takahashi, Y., Ohta, H. & Takemori, T. Fas Is Required for Clonal Selection in Germinal Centers and the Subsequent Establishment of the Memory B Cell Repertoire. **12**.
172. Hao, Z. *et al.* Fas Receptor Expression in Germinal-Center B Cells Is Essential for T and B Lymphocyte Homeostasis. *Immunity* **29**, 615–627 (2008).
173. Good-Jacobson, K. L. *et al.* PD-1 regulates germinal center B cell survival and the formation and affinity of long-lived plasma cells. *Nature Immunology* **11**, 535–542 (2010).
174. Cubas, R. A. *et al.* Inadequate T follicular cell help impairs B cell immunity during HIV infection. *Nature Medicine* **19**, 494–499 (2013).
175. Tahiliani, V., Hutchinson, T. E., Abboud, G., Croft, M. & Salek-Ardakani, S. OX40 Cooperates with ICOS To Amplify Follicular Th Cell Development and Germinal Center Reactions during Infection. *The Journal of Immunology* **198**, 218–228 (2017).
176. Cortini, A. *et al.* B cell OX40L supports T follicular helper cell development and contributes to SLE pathogenesis. *Annals of the Rheumatic Diseases* **76**, 2095–2103 (2017).
177. Ranuncolo, S. M. *et al.* Bcl-6 mediates the germinal center B cell phenotype and lymphomagenesis through transcriptional repression of the DNA-damage sensor ATR. *Nature Immunology* **8**, 705–714 (2007).
178. Niu, H., Cattoretti, G. & Dalla-Favera, R. BCL6 Controls the Expression of the B7-1/CD80 Costimulatory Receptor in Germinal Center B Cells. *Journal of Experimental Medicine* **198**, 211–221 (2003).
179. Shaffer, A. L. *et al.* BCL-6 Represses Genes that Function in Lymphocyte Differentiation, Inflammation, and Cell Cycle Control. *Immunity* **13**, 199–212 (2000).
180. Niu, H., Ye, B. H. & Dalla-Favera, R. Antigen receptor signaling induces MAP kinase-mediated phosphorylation and degradation of the BCL-6 transcription factor. *Genes & Development* **12**, 1953–1961 (1998).
181. Moriyama, M., Yamochi, T., Semba, K., Akiyama, T. & Mori, S. BCL-6 is phosphorylated at



- multiple sites in its serine- and proline-clustered region by mitogen-activated protein kinase (MAPK) in vivo. *Oncogene* **14**, 2465–2474 (1997).
182. Parekh, S. *et al.* BCL6 programs lymphoma cells for survival and differentiation through distinct biochemical mechanisms. *Blood* **110**, 2067–2074 (2007).
183. Saito, M. *et al.* A Signaling Pathway Mediating Downregulation of BCL6 in Germinal Center B Cells Is Blocked by BCL6 Gene Alterations in B Cell Lymphoma. *Cancer Cell* **12**, 280–292 (2007).
184. Lu, R. Interferon regulatory factor 4 and 8 in B-cell development. *Trends in Immunology* **29**, 487–492 (2008).
185. Linterman, M. A. *et al.* Foxp3<sup>+</sup> follicular regulatory T cells control the germinal center response. *Nature Medicine* **17**, 975–982 (2011).
186. Sage, P. T., Francisco, L. M., Carman, C. V. & Sharpe, A. H. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nature Immunology* **14**, 152–161 (2013).
187. Sage, P. T., Francisco, L. M., Carman, C. V. & Sharpe, A. H. The receptor PD-1 controls follicular regulatory T cells in the lymph nodes and blood. *Nature Immunology* **14**, 152–161 (2013).
188. Botta, D. *et al.* Dynamic regulation of T follicular regulatory cell responses by interleukin 2 during influenza infection. *Nature Immunology* **18**, 1249–1260 (2017).
189. Wu, H. *et al.* Follicular regulatory T cells repress cytokine production by follicular helper T cells and optimize IgG responses in mice. *European Journal of Immunology* **46**, 1152–1161 (2016).
190. Kawamoto, S. *et al.* Foxp3<sup>+</sup> T Cells Regulate Immunoglobulin A Selection and Facilitate Diversification of Bacterial Species Responsible for Immune Homeostasis. *Immunity* **41**, 152–165 (2014).
191. Maceiras, A. R. *et al.* T follicular helper and T follicular regulatory cells have different TCR specificity. *Nature Communications* **8**, (2017).
192. Wing, K. *et al.* CTLA-4 Control over Foxp3<sup>+</sup> Regulatory T Cell Function. *Science* **322**, 271–275 (2008).
193. Sage, P. T., Paterson, A. M., Lovitch, S. B. & Sharpe, A. H. The Coinhibitory Receptor CTLA-4 Controls B Cell Responses by Modulating T Follicular Helper, T Follicular Regulatory, and T Regulatory Cells. *Immunity* **41**, 1026–1039 (2014).
194. Miles, B. *et al.* Follicular regulatory T cells impair follicular T helper cells in HIV and SIV infection. *Nature Communications* **6**, (2015).
195. Sage, P. T. *et al.* Suppression by TFR cells leads to durable and selective inhibition of B cell effector function. *Nature Immunology* **17**, 1436–1446 (2016).
196. Fazilleau, N. *et al.* Lymphoid reservoirs of antigen-specific memory T helper cells. *Nature Immunology* **8**, 753–761 (2007).
197. MacLeod, M. K. L. *et al.* Memory CD4 T Cells That Express CXCR5 Provide Accelerated Help to B Cells. *The Journal of Immunology* **186**, 2889–2896 (2011).
198. Liu, X. *et al.* Bcl6 expression specifies the T follicular helper cell program in vivo. *The Journal of Experimental Medicine* **209**, 1841–1852 (2012).
199. Choi, Y. S. *et al.* Bcl6 Expressing Follicular Helper CD4 T Cells Are Fate Committed Early and Have the Capacity To Form Memory. *The Journal of Immunology* **190**, 4014–4026 (2013).
200. Hale, J. S. *et al.* Distinct Memory CD4<sup>+</sup> T Cells with Commitment to T Follicular Helper- and T Helper 1-Cell Lineages Are Generated after Acute Viral Infection. *Immunity* **38**, 805–817 (2013).
201. Rivino, L. *et al.* Chemokine Receptor Expression Identifies Pre-T Helper (Th)1, Pre-Th2, and Nonpolarized Cells among Human CD4<sup>+</sup> Central Memory T Cells. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 725–735 (2004).
202. Ma, C. S. *et al.* Functional STAT3 deficiency compromises the generation of human T follicular helper cells. *Blood* **119**, 3997–4008 (2012).
203. He, J. *et al.* Circulating Precursor CCR7<sup>lo</sup>PD-1<sup>hi</sup> CXCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> T Cells Indicate Tfh Cell Activity and Promote Antibody Responses upon Antigen Reexposure. *Immunity* **39**, 770–781 (2013).
204. Locci, M. *et al.* Human Circulating PD-1<sup>+</sup>CXCR3<sup>–</sup>CXCR5<sup>+</sup> Memory Tfh Cells Are Highly Functional and Correlate with Broadly Neutralizing HIV Antibody Responses. *Immunity* **39**, 758–769 (2013).
205. Bentebibel, S.-E. *et al.* Induction of ICOS<sup>+</sup>CXCR3<sup>+</sup>CXCR5<sup>+</sup> TH Cells Correlates with Antibody Responses to Influenza Vaccination. *Science Translational Medicine* **5**, 176ra32-176ra32 (2013).
206. Schmitt, N., Bentebibel, S.-E. & Ueno, H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends in Immunology* **35**, 436–442 (2014).
207. Ise, W. *et al.* Memory B cells contribute to rapid Bcl6 expression by memory follicular helper T

- cells. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **111**, 11792–11797 (2014).
208. Chevalier, N. *et al.* CXCR5 Expressing Human Central Memory CD4 T Cells and Their Relevance for Humoral Immune Responses. *The Journal of Immunology* **186**, 5556–5568 (2011).
209. Morita, R. *et al.* Human Blood CXCR5+CD4+ T Cells Are Counterparts of T Follicular Cells and Contain Specific Subsets that Differentially Support Antibody Secretion. *Immunity* **34**, 108–121 (2011).
210. Boswell, K. L. *et al.* Loss of Circulating CD4 T Cells with B Cell Helper Function during Chronic HIV Infection. *PLoS Pathogens* **10**, e1003853 (2014).
211. Sage, P. T., Alvarez, D., Godec, J., von Andrian, U. H. & Sharpe, A. H. Circulating T follicular regulatory and helper cells have memory-like properties. *Journal of Clinical Investigation* **124**, 5191–5204 (2014).
212. Fonseca, V. R. *et al.* Human blood T<sub>fr</sub> cells are indicators of ongoing humoral activity not fully licensed with suppressive function. *Science Immunology* **2**, eaan1487 (2017).
213. Zaretsky, A. G. *et al.* T follicular helper cells differentiate from Th2 cells in response to helminth antigens. *The Journal of Experimental Medicine* **206**, 991–999 (2009).
214. Reinhardt, R. L., Liang, H.-E. & Locksley, R. M. Cytokine-secreting follicular T cells shape the antibody repertoire. *Nature Immunology* **10**, 385–393 (2009).
215. Tsuji, M. *et al.* Preferential Generation of Follicular B Helper T Cells from Foxp3+ T Cells in Gut Peyer’s Patches. *Science* **323**, 1488–1492 (2009).
216. Lu, K. T. *et al.* Functional and Epigenetic Studies Reveal Multistep Differentiation and Plasticity of In Vitro-Generated and In Vivo-Derived Follicular T Helper Cells. *Immunity* **35**, 622–632 (2011).
217. Lüthje, K. *et al.* The development and fate of follicular helper T cells defined by an IL-21 reporter mouse. *Nature Immunology* **13**, 491–498 (2012).
218. Weinstein, J. S. *et al.* STAT4 and T-bet control follicular helper T cell development in viral infections. *Journal of Experimental Medicine* **215**, 337–355 (2018).
219. Fang, D. *et al.* Transient T-bet expression functionally specifies a distinct T follicular helper subset. *Journal of Experimental Medicine* **215**, 2705–2714 (2018).
220. Crotty, S. Do Memory CD4 T Cells Keep Their Cell-Type Programming: Plasticity versus Fate Commitment?: Complexities of Interpretation due to the Heterogeneity of Memory CD4 T Cells, Including T Follicular Helper Cells. *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology* **10**, a032102 (2018).
221. Fang, D. & Zhu, J. Dynamic balance between master transcription factors determines the fates and functions of CD4 T cell and innate lymphoid cell subsets. *Journal of Experimental Medicine* **214**, 1861–1876 (2017).
222. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Biology: A Decade of Discovery and Diseases. *Immunity* **50**, 1132–1148 (2019).
223. Humby, F. *et al.* Ectopic Lymphoid Structures Support Ongoing Production of Class-Switched Autoantibodies in Rheumatoid Synovium. *PLoS Medicine* **6**, e1 (2009).
224. Bird, A. K., Meednu, N. & Anolik, J. H. New insights into B cell biology in systemic lupus erythematosus and Sjögren’s syndrome: *Current Opinion in Rheumatology* **27**, 461–467 (2015).
225. Corsiero, E. *et al.* Role of lymphoid chemokines in the development of functional ectopic lymphoid structures in rheumatic autoimmune diseases. *Immunology Letters* **145**, 62–67 (2012).
226. Magliozzi, R. *et al.* Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain* **130**, 1089–1104 (2007).
227. Luther, S. A., Lopez, T., Bai, W., Hanahan, D. & Cyster, J. G. BLC Expression in Pancreatic Islets Causes B Cell Recruitment and Lymphotoxin-Dependent Lymphoid Neogenesis. *Immunity* **12**, 471–481 (2000).
228. Meeuwisse, C. M. *et al.* Identification of CXCL13 as a marker for rheumatoid arthritis outcome using an in silico model of the rheumatic joint. *Arthritis & Rheumatism* **63**, 1265–1273 (2011).
229. Pitzalis, C., Jones, G. W., Bombardieri, M. & Jones, S. A. Ectopic lymphoid-like structures in infection, cancer and autoimmunity. *Nature Reviews Immunology* **14**, 447–462 (2014).
230. Pontarini, E. *et al.* Unique expansion of IL-21+ Tfh and Tph cells under control of ICOS identifies Sjögren’s syndrome with ectopic germinal centres and MALT lymphoma. *Annals of the Rheumatic Diseases* annrheumdis-2020-217646 (2020) doi:10.1136/annrheumdis-2020-217646.
231. Hostmann, A., Jacobi, A., Mei, H., Hiepe, F. & Dörner, T. Peripheral B cell abnormalities and disease activity in systemic lupus erythematosus. *Lupus* **17**, 1064–1069 (2008).
232. Zhang, X. *et al.* Circulating CXCR5<sup>+</sup> CD4<sup>+</sup> helper T cells in systemic lupus erythematosus patients

- share phenotypic properties with germinal center follicular helper T cells and promote antibody production. *Lupus* **24**, 909–917 (2015).
233. Simpson, N. *et al.* Expansion of circulating T cells resembling follicular helper T cells is a fixed phenotype that identifies a subset of severe systemic lupus erythematosus. *Arthritis & Rheumatism* **62**, 234–244 (2010).
234. Le Coz, C. *et al.* Circulating TFH Subset Distribution Is Strongly Affected in Lupus Patients with an Active Disease. *PLoS ONE* **8**, e75319 (2013).
235. Wang, L. *et al.* Increased Interleukin 21 and Follicular Helper T-like Cells and Reduced Interleukin 10+ B cells in Patients with New-onset Systemic Lupus Erythematosus. *The Journal of Rheumatology* **41**, 1781–1792 (2014).
236. Lan, Y., Luo, B., Wang, J.-L., Jiang, Y.-W. & Wei, Y.-S. The association of interleukin-21 polymorphisms with interleukin-21 serum levels and risk of systemic lupus erythematosus. *Gene* **538**, 94–98 (2014).
237. Wong, C. K. *et al.* Elevated Production of B Cell Chemokine CXCL13 is Correlated with Systemic Lupus Erythematosus Disease Activity. *Journal of Clinical Immunology* **30**, 45–52 (2010).
238. Wang, X. *et al.* The shifted balance between circulating follicular regulatory T cells and follicular helper T cells in patients with ulcerative colitis. *Clinical Science* **131**, 2933–2945 (2017).
239. Wang, Z. *et al.* Circulating follicular helper T cells in Crohn’s disease (CD) and CD-associated colorectal cancer. *Tumor Biology* **35**, 9355–9359 (2014).
240. Yu, J. *et al.* Interleukin-21 promotes the development of ulcerative colitis and regulates the proliferation and secretion of follicular T helper cells in the colitides microenvironment. *Molecular Medicine Reports* **11**, 1049–1056 (2015).
241. Li, X. *et al.* Role of the frequency of blood CD4+ CXCR5+ CCR6+ T cells in autoimmunity in patients with Sjögren’s syndrome. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **422**, 238–244 (2012).
242. Salomonsson, S. *et al.* Cellular basis of ectopic germinal center formation and autoantibody production in the target organ of patients with Sjögren’s syndrome: Ectopic Germinal Center Formation in Sjögren’s Syndrome. *Arthritis & Rheumatism* **48**, 3187–3201 (2003).
243. Barone, F. *et al.* Association of CXCL13 and CCL21 expression with the progressive organization of lymphoid-like structures in Sjögren’s syndrome. *Arthritis & Rheumatism* **52**, 1773–1784 (2005).
244. Fonseca, V. R. *et al.* The Ratio of Blood T Follicular Regulatory Cells to T Follicular Helper Cells Marks Ectopic Lymphoid Structure Formation While Activated Follicular Helper T Cells Indicate Disease Activity in Primary Sjögren’s Syndrome. *Arthritis & Rheumatology* **70**, 774–784 (2018).
245. Talley, C. L. The Emergence of Multiple Sclerosis as a Nosological Category in France, 1838?1868. *Journal of the History of the Neurosciences* **12**, 250–265 (2003).
246. Cook, S. D. & Goetz, C. G. Multiple Sclerosis. *ARCH NEUROL* **55**, 3 (1998).
247. Love, S. Demyelinating diseases. *Journal of Clinical Pathology* **59**, 1151–1159 (2006).
248. Popescu, B. F. Gh. & Lucchinetti, C. F. Pathology of Demyelinating Diseases. *Annual Review of Pathology: Mechanisms of Disease* **7**, 185–217 (2012).
249. Magliozzi, R. *et al.* Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis: Intrathecal Inflammation in MS. *Annals of Neurology* **83**, 739–755 (2018).
250. Prineas, J. W. *et al.* Immunopathology of secondary-progressive multiple sclerosis. *Annals of Neurology* **50**, 646–657 (2001).
251. Bø, L., Vedeler, C. A., Nyland, H. I., Trapp, B. D. & Mørk, S. J. Subpial Demyelination in the Cerebral Cortex of Multiple Sclerosis Patients. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **62**, 723–732 (2003).
252. Kutzelnigg, A. *et al.* Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain* **128**, 2705–2712 (2005).
253. Kuhlmann, T. *et al.* Differentiation block of oligodendroglial progenitor cells as a cause for remyelination failure in chronic multiple sclerosis. *Brain* **131**, 1749–1758 (2008).
254. Lucchinetti, C. & Bruck, W. The pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* **10**, S23–S30 (2004).
255. Wingerchuk, D. M. & Carter, J. L. Multiple Sclerosis: Current and Emerging Disease-Modifying Therapies and Treatment Strategies. *Mayo Clinic Proceedings* **89**, 225–240 (2014).
256. Küçükali, C. İ., Kürtüncü, M., Çoban, A., Çebi, M. & Tüzün, E. Epigenetics of Multiple Sclerosis: An Updated Review. *NeuroMolecular Medicine* **17**, 83–96 (2015).
257. Masterman, T. *et al.* HLA-DR15 is associated with lower age at onset in multiple sclerosis. *Annals*

- of Neurology* **48**, 211–219 (2000).
258. Healy, B. C. *et al.* Protective effects in MS susceptibility and MRI outcome measures. *7* (2010).
  259. Isobe, N. *et al.* Association of HLA Genetic Risk Burden With Disease Phenotypes in Multiple Sclerosis. *JAMA Neurology* **73**, 795 (2016).
  260. Risk Alleles for Multiple Sclerosis Identified by a Genomewide Study. *New England Journal of Medicine* **357**, 851–862 (2007).
  261. Jabalameli, M., Bahreini, S., Ashtari, F. & Zahednasab, H. Quantifying environmental risk factors for multiple sclerosis in discordant monozygotic twins: A case report. *Acta Medica International* **2**, 178 (2015).
  262. Dobson, R., Kuhle, J., Middeldorp, J. & Giovannoni, G. Epstein-Barr–negative MS: a true phenomenon? *Neurology - Neuroimmunology Neuroinflammation* **4**, e318 (2017).
  263. Tzartos, J. S. *et al.* Association of innate immune activation with latent Epstein-Barr virus in active MS lesions. *Neurology* **78**, 15–23 (2012).
  264. Lünemann, J. D. *et al.* EBNA1-specific T cells from patients with multiple sclerosis cross react with myelin antigens and co-produce IFN- $\gamma$  and IL-2. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 1763–1773 (2008).
  265. Mechelli, R. *et al.* Epstein-Barr virus genetic variants are associated with multiple sclerosis. *Neurology* **84**, 1362–1368 (2015).
  266. Nociti, V. *et al.* Epstein-Barr virus antibodies in serum and cerebrospinal fluid from Multiple sclerosis, Chronic Inflammatory Demyelinating Polyradiculoneuropathy and Amyotrophic Lateral Sclerosis. *Journal of Neuroimmunology* **225**, 149–152 (2010).
  267. Hassani, A., Corboy, J. R., Al-Salam, S. & Khan, G. Epstein-Barr virus is present in the brain of most cases of multiple sclerosis and may engage more than just B cells. *PLOS ONE* **13**, e0192109 (2018).
  268. Magliozzi, R. *et al.* B-Cell Enrichment and Epstein-Barr Virus Infection in Inflammatory Cortical Lesions in Secondary Progressive Multiple Sclerosis. *Journal of Neuropathology & Experimental Neurology* **72**, 29–41 (2013).
  269. Wanke, F. *et al.* EB12 Is Highly Expressed in Multiple Sclerosis Lesions and Promotes Early CNS Migration of Encephalitogenic CD4 T Cells. *Cell Reports* **18**, 1270–1284 (2017).
  270. Smatti, M. K. *et al.* Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. *Frontiers in Oncology* **8**, (2018).
  271. Giovannoni, G. & Ebers, G. Multiple sclerosis: the environment and causation: *Current Opinion in Neurology* **20**, 261–268 (2007).
  272. Boucher, A., Desforges, M., Duquette, P. & Talbot, P. J. Long-term human coronavirus-myelin cross-reactive T-cell clones derived from multiple sclerosis patients. *Clinical Immunology* **123**, 258–267 (2007).
  273. Alonso, A. & Hernan, M. A. Temporal trends in the incidence of multiple sclerosis: A systematic review. *Neurology* **71**, 129–135 (2008).
  274. Dehghanian, F., Nabavizadeh, N., Kamali, E., Moeinifar, N. & Motovali-Bashi, M. A Complete Review on Epigenetic Biomarkers in MS. in *Neuroinflammation* 619–637 (Elsevier, 2018). doi:10.1016/B978-0-12-811709-5.00039-9.
  275. Islam, T., Gauderman, W. J., Cozen, W. & Mack, T. M. Childhood sun exposure influences risk of multiple sclerosis in monozygotic twins. *Neurology* **69**, 381–388 (2007).
  276. Sintzel, M. B., Rametta, M. & Reder, A. T. Vitamin D and Multiple Sclerosis: A Comprehensive Review. *Neurology and Therapy* **7**, 59–85 (2018).
  277. Mowry, E. M. *et al.* Vitamin D status predicts new brain magnetic resonance imaging activity in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* **72**, 234–240 (2012).
  278. Hupperts, R. *et al.* Randomized trial of daily high-dose vitamin D<sub>3</sub> in patients with RRMS receiving subcutaneous interferon  $\beta$ -1a. *Neurology* 10.1212/WNL.0000000000008445 (2019) doi:10.1212/WNL.0000000000008445.
  279. Hellings, N. *et al.* T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *Journal of Neuroscience Research* **63**, 290–302 (2001).
  280. Zaffaroni, M. Biological indicators of the neurodegenerative phase of multiple sclerosis. *Neurological Sciences* **24**, s279–s282 (2003).
  281. Gold, R. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain* **129**, 1953–1971 (2006).

282. 't Hart, B. A., Gran, B. & Weissert, R. EAE: imperfect but useful models of multiple sclerosis. *Trends in Molecular Medicine* **17**, 119–125 (2011).
283. Mix, E., Meyer-Rienecker, H., Hartung, H.-P. & Zettl, U. K. Animal models of multiple sclerosis—Potentials and limitations. *Progress in Neurobiology* **92**, 386–404 (2010).
284. Litzenburger, T. *et al.* B Lymphocytes Producing Demyelinating Autoantibodies: Development and Function in Gene-targeted Transgenic Mice. 12.
285. Glatigny, S. & Bettelli, E. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harbor Perspectives in Medicine* **8**, a028977 (2018).
286. Louveau, A. *et al.* Structural and functional features of central nervous system lymphatic vessels. *Nature* **523**, 337–341 (2015).
287. Meeker, R. B., Williams, K., Killebrew, D. A. & Hudson, L. C. Cell trafficking through the choroid plexus. *Cell Adhesion & Migration* **6**, 390–396 (2012).
288. Ortiz, G. G. *et al.* Role of the Blood–Brain Barrier in Multiple Sclerosis. *Archives of Medical Research* **45**, 687–697 (2014).
289. Charabati, M., Rabanel, J.-M., Ramassamy, C. & Prat, A. Overcoming the Brain Barriers: From Immune Cells to Nanoparticles. *Trends in Pharmacological Sciences* **41**, 42–54 (2020).
290. Reboldi, A. *et al.* 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**, 514–523 (2009).
291. Cramer, S. P., Simonsen, H., Frederiksen, J. L., Rostrup, E. & Larsson, H. B. W. Abnormal blood–brain barrier permeability in normal appearing white matter in multiple sclerosis investigated by MRI. *NeuroImage: Clinical* **4**, 182–189 (2014).
292. Kettenmann, H., Kirchhoff, F. & Verkhratsky, A. Microglia: New Roles for the Synaptic Stripper. *Neuron* **77**, 10–18 (2013).
293. Du, L. *et al.* Role of Microglia in Neurological Disorders and Their Potentials as a Therapeutic Target. *Molecular Neurobiology* **54**, 7567–7584 (2017).
294. Yamasaki, R. *et al.* Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *Journal of Experimental Medicine* **211**, 1533–1549 (2014).
295. Valentin-Torres, A. *et al.* Sustained TNF production by central nervous system infiltrating macrophages promotes progressive autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroinflammation* **13**, (2016).
296. Jiang, H.-R. *et al.* IL-33 attenuates EAE by suppressing IL-17 and IFN- $\gamma$  production and inducing alternatively activated macrophages: Immunomodulation. *European Journal of Immunology* **42**, 1804–1814 (2012).
297. Chu, F. *et al.* The roles of macrophages and microglia in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Neuroimmunology* **318**, 1–7 (2018).
298. Vogel, D. Y. S. *et al.* GM-CSF promotes migration of human monocytes across the blood brain barrier: Molecular immunology. *European Journal of Immunology* **45**, 1808–1819 (2015).
299. Pelfrey, C. M. *et al.* Quantification of Self-Recognition in Multiple Sclerosis by Single-Cell Analysis of Cytokine Production. *The Journal of Immunology* **165**, 1641–1651 (2000).
300. Kaskow, B. J. & Baecher-Allan, C. Effector T Cells in Multiple Sclerosis. *Cold Spring Harb Perspect Med* **8**, a029025 (2018).
301. Kroenke, M. A., Carlson, T. J., Andjelkovic, A. V. & Segal, B. M. IL-12– and IL-23–modulated T cells induce distinct types of EAE based on histology, CNS chemokine profile, and response to cytokine inhibition. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 1535–1541 (2008).
302. Bettelli, E. *et al.* Loss of T-bet, But Not STAT1, Prevents the Development of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine* **200**, 79–87 (2004).
303. Cua, D. J. *et al.* Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain. *Nature* **421**, 744–748 (2003).
304. Sutton, C., Brereton, C., Keogh, B., Mills, K. H. G. & Lavelle, E. C. A crucial role for interleukin (IL)-1 in the induction of IL-17–producing T cells that mediate autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Experimental Medicine* **203**, 1685–1691 (2006).
305. O'Connor, R. A. *et al.* Cutting Edge: Th1 Cells Facilitate the Entry of Th17 Cells to the Central Nervous System during Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **181**, 3750–3754 (2008).
306. Domingues, H. S., Mues, M., Lassmann, H., Wekerle, H. & Krishnamoorthy, G. Functional and Pathogenic Differences of Th1 and Th17 Cells in Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *PLoS ONE* **5**, e15531 (2010).

307. Kebir, H. *et al.* Preferential recruitment of interferon- $\gamma$ -expressing T<sub>H</sub> 17 cells in multiple sclerosis. *Ann Neurol* **66**, 390–402 (2009).
308. Cao, Y. *et al.* Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Science Translational Medicine* **7**, 287ra74–287ra74 (2015).
309. Fletcher, J. M., Lalor, S. J., Sweeney, C. M., Tubridy, N. & Mills, K. H. G. T cells in multiple sclerosis and experimental autoimmune encephalomyelitis: T cells in MS and EAE. *Clinical & Experimental Immunology* **162**, 1–11 (2010).
310. Lock, C. *et al.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nature Medicine* **8**, 500–508 (2002).
311. van Langelaar, J. *et al.* T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain* **141**, 1334–1349 (2018).
312. Brucklacher-Waldert, V., Stuermer, K., Kolster, M., Wolthausen, J. & Tolosa, E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain* **132**, 3329–3341 (2009).
313. Kebir, H. *et al.* Human TH17 lymphocytes promote blood-brain barrier disruption and central nervous system inflammation. *Nat Med* **13**, 1173–1175 (2007).
314. Kallaur, A. P. *et al.* Cytokine profile in relapsing-remitting multiple sclerosis patients and the association between progression and activity of the disease. *Molecular Medicine Reports* **7**, 1010–1020 (2013).
315. Coquet, J. M., Chakravarti, S., Smyth, M. J. & Godfrey, D. I. Cutting Edge: IL-21 Is Not Essential for Th17 Differentiation or Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **180**, 7097–7101 (2008).
316. Kreyborg, K. *et al.* IL-22 Is Expressed by Th17 Cells in an IL-23-Dependent Fashion, but Not Required for the Development of Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **179**, 8098–8104 (2007).
317. McGinley, A. M. *et al.* Interleukin-17A Serves a Priming Role in Autoimmunity by Recruiting IL-1 $\beta$ -Producing Myeloid Cells that Promote Pathogenic T Cells. *Immunity* **52**, 342–356.e6 (2020).
318. Eugster, H.-P., Frei, K., Kopf, M., Lassmann, H. & Fontana, A. IL-6-deficient mice resist myelin oligodendrocyte glycoprotein-induced autoimmune encephalomyelitis. *European Journal of Immunology* **28**, 2178–2187 (1998).
319. Matsuki, T., Nakae, S., Sudo, K., Horai, R. & Iwakura, Y. Abnormal T cell activation caused by the imbalance of the IL-1/IL-1R antagonist system is responsible for the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *International Immunology* **18**, 399–407 (2006).
320. McQualter, J. L. *et al.* Granulocyte Macrophage Colony-stimulating Factor: A New Putative Therapeutic Target in Multiple Sclerosis. 9.
321. Marusic, S. *et al.* Local delivery of granulocyte macrophage colony-stimulating factor by retrovirally transduced antigen-specific T cells leads to severe, chronic experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. *Neuroscience Letters* **332**, 185–189 (2002).
322. El-Behi, M. *et al.* The encephalitogenicity of TH17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nature Immunology* **12**, 568–575 (2011).
323. McMahon, E. J., Bailey, S. L., Castenada, C. V., Waldner, H. & Miller, S. D. Epitope spreading initiates in the CNS in two mouse models of multiple sclerosis. *Nature Medicine* **11**, 335–339 (2005).
324. Perriard, G. *et al.* Interleukin-22 is increased in multiple sclerosis patients and targets astrocytes. *Journal of Neuroinflammation* **12**, (2015).
325. Ponomarev, E. D., Shriver, L. P., Maresz, K. & Dittel, B. N. Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity. *Journal of Neuroscience Research* **81**, 374–389 (2005).
326. Wolf, Y. *et al.* Microglial MHC class II is dispensable for experimental autoimmune encephalomyelitis and cuprizone-induced demyelination. *European Journal of Immunology* **48**, 1308–1318 (2018).
327. Aloisi, F., Ria, F. & Adorini, L. Regulation of T-cell responses by CNS antigen-presenting cells: different roles for microglia and astrocytes. *Immunology Today* **21**, 141–147 (2000).
328. Babbe, H. *et al.* Clonal Expansions of CD8 $\alpha$  T Cells Dominate the T Cell Infiltrate in Active Multiple Sclerosis Lesions as Shown by Micromanipulation and Single Cell Polymerase Chain Reaction. 12.
329. Jilek, S. *et al.* CSF enrichment of highly differentiated CD8<sup>+</sup> T cells in early multiple sclerosis. *Clinical Immunology* **123**, 105–113 (2007).
330. Kuhlmann, T. Acute axonal damage in multiple sclerosis is most extensive in early disease stages and decreases over time. *Brain* **125**, 2202–2212 (2002).

331. Huseby, E. S., Huseby, P. G., Shah, S., Smith, R. & Stadinski, B. D. Pathogenic CD8 T Cells in Multiple Sclerosis and Its Experimental Models. *Frontiers in Immunology* **3**, (2012).
332. Joffre, O. P., Segura, E., Savina, A. & Amigorena, S. Cross-presentation by dendritic cells. *Nature Reviews Immunology* **12**, 557–569 (2012).
333. Junker, A. *et al.* Multiple sclerosis: T-cell receptor expression in distinct brain regions. *Brain* **130**, 2789–2799 (2007).
334. Tzartos, J. S. *et al.* Interleukin-17 Production in Central Nervous System-Infiltrating T Cells and Glial Cells Is Associated with Active Disease in Multiple Sclerosis. *The American Journal of Pathology* **172**, 146–155 (2008).
335. Freedman, M. S. *et al.* Recommended Standard of Cerebrospinal Fluid Analysis in the Diagnosis of Multiple Sclerosis: A Consensus Statement. *Archives of Neurology* **62**, (2005).
336. Henderson, A. P. D., Barnett, M. H., Parratt, J. D. E. & Prineas, J. W. Multiple sclerosis: Distribution of inflammatory cells in newly forming lesions. *Annals of Neurology* **66**, 739–753 (2009).
337. Disanto, G., Morahan, J. M., Barnett, M. H., Giovannoni, G. & Ramagopalan, S. V. The evidence for a role of B cells in multiple sclerosis. *Neurology* **78**, 823–832 (2012).
338. Hedegaard, C. J. *et al.* Autoantibodies to myelin basic protein (MBP) in healthy individuals and in patients with multiple sclerosis: a role in regulating cytokine responses to MBP. *Immunology* **128**, e451–e461 (2009).
339. Kinzel, S. *et al.* Myelin-reactive antibodies initiate T cell-mediated CNS autoimmune disease by opsonization of endogenous antigen. *Acta Neuropathologica* **132**, 43–58 (2016).
340. Blauth, K. *et al.* Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid cause demyelination of spinal cord explants. *Acta Neuropathologica* **130**, 765–781 (2015).
341. Li, R. *et al.* Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology* **6**, (2016).
342. Machado-Santos, J. *et al.* The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8<sup>+</sup> T lymphocytes and B cells. *Brain* **141**, 2066–2082 (2018).
343. Matsumoto, M. *et al.* Interleukin-10-Producing Plasmablasts Exert Regulatory Function in Autoimmune Inflammation. *Immunity* **41**, 1040–1051 (2014).
344. Lee-Chang, C. *et al.* B-cell subsets up-regulate  $\alpha$ 4 integrin and accumulate in the cerebrospinal fluid in clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis onset. *Neuroscience Letters* **487**, 273–277 (2011).
345. Genç, K., Dona, D. L. & Reder, A. T. Increased CD80<sup>2</sup> B Cells in Active Multiple Sclerosis and Reversal by Interferon  $\alpha$ -1b Therapy. **8**.
346. Mathias, A. *et al.* Increased ex vivo antigen presentation profile of B cells in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* **23**, 802–809 (2017).
347. Wekerle, H. B cells in multiple sclerosis. *Autoimmunity* **50**, 57–60 (2017).
348. Pöllinger, B. *et al.* Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1303–1316 (2009).
349. Molnarfi, N. *et al.* MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *Journal of Experimental Medicine* **210**, 2921–2937 (2013).
350. Harp, C. T. *et al.* Memory B cells from a subset of treatment-naïve relapsing-remitting multiple sclerosis patients elicit CD4<sup>+</sup> T-cell proliferation and IFN- $\gamma$  production in response to myelin basic protein and myelin oligodendrocyte glycoprotein. *European Journal of Immunology* **40**, 2942–2956 (2010).
351. Barr, T. A. *et al.* B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *Journal of Experimental Medicine* **209**, 1001–1010 (2012).
352. van de Veerdonk, F. L. *et al.* The anti-CD20 antibody rituximab reduces the Th17 cell response. *Arthritis & Rheumatism* **63**, 1507–1516 (2011).
353. Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. & Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nature Immunology* **3**, 944–950 (2002).
354. Yoshizaki, A. *et al.* Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* **491**, 264–268 (2012).
355. Fischer, M. T. *et al.* NADPH oxidase expression in active multiple sclerosis lesions in relation to oxidative tissue damage and mitochondrial injury. *Brain* **135**, 886–899 (2012).

356. Bevan, R. J. *et al.* Meningeal inflammation and cortical demyelination in acute multiple sclerosis: Meningeal Inflammation in MS. *Annals of Neurology* **84**, 829–842 (2018).
357. Magliozzi, R. *et al.* A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/ana.22230> (2010) doi:10.1002/ana.22230.
358. Choi, S. R. *et al.* Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain* **135**, 2925–2937 (2012).
359. Gharibi, T. *et al.* Investigation of IL-21 gene polymorphisms (rs2221903, rs2055979) in cases with multiple sclerosis of Azerbaijan, Northwest Iran. **8**.
360. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium *et al.* MANBA, CXCR5, SOX8, RPS6KB1 and ZBTB46 are genetic risk loci for multiple sclerosis. *Brain* **136**, 1778–1782 (2013).
361. Magliozzi, R. *et al.* The CSF Profile Linked to Cortical Damage Predicts Multiple Sclerosis Activity. *Annals of Neurology* **88**, 562–573 (2020).
362. Christensen, J. R. *et al.* Systemic Inflammation in Progressive Multiple Sclerosis Involves Follicular T-Helper, Th17- and Activated B-Cells and Correlates with Progression. *PLoS ONE* **8**, e57820 (2013).
363. Gharibi, T. *et al.* IL-21 and IL-21-producing T cells are involved in multiple sclerosis severity and progression. *Immunology Letters* **216**, 12–20 (2019).
364. Quinn, J. L., Kumar, G., Agasing, A., Ko, R. M. & Axtell, R. C. Role of TFH Cells in Promoting T Helper 17-Induced Neuroinflammation. *Frontiers in Immunology* **9**, (2018).
365. Peters, A. *et al.* Th17 Cells Induce Ectopic Lymphoid Follicles in Central Nervous System Tissue Inflammation. *Immunity* **35**, 986–996 (2011).
366. Krumbholz, M. *et al.* Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment. *Brain* **129**, 200–211 (2006).
367. Khademi, M. *et al.* Cerebrospinal fluid CXCL13 in multiple sclerosis: a suggestive prognostic marker for the disease course. *Multiple Sclerosis Journal* **17**, 335–343 (2011).
368. Schmitt, N. Role of T Follicular Helper cells in Multiple Sclerosis. *J Nat Sci* **1**, e139 (2015).
369. Puthenparampil, M. *et al.* Peripheral imbalanced TFH/TFR ratio correlates with intrathecal IgG synthesis in multiple sclerosis at clinical onset. *Multiple Sclerosis Journal* **25**, 918–926 (2019).
370. Thursby, E. & Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochemical Journal* **474**, 1823–1836 (2017).
371. Derrien, M., Alvarez, A.-S. & de Vos, W. M. The Gut Microbiota in the First Decade of Life. *Trends in Microbiology* **27**, 997–1010 (2019).
372. MetaHIT Consortium *et al.* An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nature Biotechnology* **32**, 834–841 (2014).
373. Backhed, F. *et al.* The gut microbiota as an environmental factor that regulates fat storage. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **101**, 15718–15723 (2004).
374. Baquero, F. & Nombela, C. The microbiome as a human organ. *Clinical Microbiology and Infection* **18**, 2–4 (2012).
375. Schroeder, B. O. & Bäckhed, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nature Medicine* **22**, 1079–1089 (2016).
376. Burgueño, J. F. & Abreu, M. T. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* (2020) doi:10.1038/s41575-019-0261-4.
377. Bauer, H. & Levenson, S. M. THE RESPONSE OF THE LYMPHATIC TISSUE TO THE MICROBIAL FLORA. STUDIES ON GERM-FREE MICE. **42**, 13.
378. Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y. & Núñez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nature Reviews Immunology* **13**, 321–335 (2013).
379. Brown, E. M., Sadarangani, M. & Finlay, B. B. The role of the immune system in governing host-microbe interactions in the intestine. *Nature Immunology* **14**, 660–667 (2013).
380. Wang, S., Ye, Q., Zeng, X. & Qiao, S. Functions of Macrophages in the Maintenance of Intestinal Homeostasis. *Journal of Immunology Research* **2019**, 1–8 (2019).
381. Smythies, L. E. *et al.* Human intestinal macrophages display profound inflammatory anergy despite avid phagocytic and bacteriocidal activity. *Journal of Clinical Investigation* **115**, 66–75 (2005).
382. Coombes, J. L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103<sup>+</sup> DCs induces Foxp3<sup>+</sup> regulatory T cells via a TGF- $\beta$ - and retinoic acid-dependent mechanism. *The Journal of Experimental Medicine* **204**, 1757–1764 (2007).
383. Bernardo, D. *et al.* Microbiota/Host Crosstalk Biomarkers: Regulatory Response of Human



- Intestinal Dendritic Cells Exposed to Lactobacillus Extracellular Encrypted Peptide. *PLoS ONE* **7**, e36262 (2012).
384. Vaishnava, S. *et al.* The Antibacterial Lectin RegIII Promotes the Spatial Segregation of Microbiota and Host in the Intestine. *Science* **334**, 255–258 (2011).
385. Vaishnava, S., Behrendt, C. L., Ismail, A. S., Eckmann, L. & Hooper, L. V. Paneth cells directly sense gut commensals and maintain homeostasis at the intestinal host-microbial interface. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **105**, 20858–20863 (2008).
386. López, P., González-Rodríguez, I., Gueimonde, M., Margolles, A. & Suárez, A. Immune Response to Bifidobacterium bifidum Strains Support Treg/Th17 Plasticity. *PLoS ONE* **6**, e24776 (2011).
387. Pickert, G. *et al.* STAT3 links IL-22 signaling in intestinal epithelial cells to mucosal wound healing. *Journal of Experimental Medicine* **206**, 1465–1472 (2009).
388. Zheng, Y. *et al.* Interleukin-22 mediates early host defense against attaching and effacing bacterial pathogens. *Nature Medicine* **14**, 282–289 (2008).
389. Sonnenberg, G. F. *et al.* Innate Lymphoid Cells Promote Anatomical Containment of Lymphoid-Resident Commensal Bacteria. *Science* **336**, 1321–1325 (2012).
390. Goto, Y. *et al.* Innate lymphoid cells regulate intestinal epithelial cell glycosylation. *Science* **345**, 1254009–1254009 (2014).
391. Hepworth, M. R. *et al.* Group 3 innate lymphoid cells mediate intestinal selection of commensal bacteria-specific CD4<sup>+</sup> T cells. *Science* **348**, (2015).
392. Gaboriau-Routhiau, V. *et al.* The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity* **31**, 677–689 (2009).
393. Ivanov, I. I. *et al.* Specific Microbiota Direct the Differentiation of IL-17-Producing T-Helper Cells in the Mucosa of the Small Intestine. *Cell Host & Microbe* **4**, 337–349 (2008).
394. Gaboriau-Routhiau, V. *et al.* The Key Role of Segmented Filamentous Bacteria in the Coordinated Maturation of Gut Helper T Cell Responses. *Immunity* **31**, 677–689 (2009).
395. Ivanov, I. I. *et al.* Induction of Intestinal Th17 Cells by Segmented Filamentous Bacteria. *Cell* **139**, 485–498 (2009).
396. Geuking, M. B. *et al.* Intestinal Bacterial Colonization Induces Mutualistic Regulatory T Cell Responses. *Immunity* **34**, 794–806 (2011).
397. Atarashi, K. *et al.* Induction of Colonic Regulatory T Cells by Indigenous Clostridium Species. *Science* **331**, 337–341 (2011).
398. Geva-Zatorsky, N. *et al.* Mining the Human Gut Microbiota for Immunomodulatory Organisms. *Cell* **168**, 928-943.e11 (2017).
399. Denning, T. L., Kim, G. & Kronenberg, M. Cutting Edge: CD4<sup>+</sup> CD25<sup>+</sup> Regulatory T Cells Impaired for Intestinal Homing Can Prevent Colitis. *The Journal of Immunology* **174**, 7487–7491 (2005).
400. Kespohl, M. *et al.* The Microbial Metabolite Butyrate Induces Expression of Th1-Associated Factors in CD4<sup>+</sup> T Cells. *Frontiers in Immunology* **8**, (2017).
401. Round, J. L. *et al.* The Toll-Like Receptor 2 Pathway Establishes Colonization by a Commensal of the Human Microbiota. *Science* **332**, 974–977 (2011).
402. Round, J. L. & Mazmanian, S. K. Inducible Foxp3<sup>+</sup> regulatory T-cell development by a commensal bacterium of the intestinal microbiota. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **107**, 12204–12209 (2010).
403. Bachem, A. *et al.* Microbiota-Derived Short-Chain Fatty Acids Promote the Memory Potential of Antigen-Activated CD8<sup>+</sup> T Cells. *Immunity* **51**, 285-297.e5 (2019).
404. Allez, M., Brimnes, J., Dotan, I. & Mayer, L. Expansion of CD8<sup>+</sup> T cells with regulatory function after interaction with intestinal epithelial cells. *Gastroenterology* **123**, 1516–1526 (2002).
405. Mishima, Y. *et al.* Microbiota maintain colonic homeostasis by activating TLR2/MyD88/PI3K signaling in IL-10–producing regulatory B cells. *Journal of Clinical Investigation* **129**, 3702–3716 (2019).
406. Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O. & Suzuki, K. Adaptive Immune Regulation in the Gut: T Cell–Dependent and T Cell–Independent IgA Synthesis. *Annual Review of Immunology* **28**, 243–273 (2010).
407. Strugnell, R. A. & Wijburg, O. L. C. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nature Reviews Microbiology* **8**, 656–667 (2010).
408. Fagarasan, S. Critical Roles of Activation-Induced Cytidine Deaminase in the Homeostasis of Gut Flora. *Science* **298**, 1424–1427 (2002).

409. Mora, J. R. *et al.* Generation of Gut-Homing IgA-Secreting B Cells by Intestinal Dendritic Cells. *Science* **314**, 1157–1160 (2006).
410. Tezuka, H. *et al.* Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* **448**, 929–933 (2007).
411. Lindner, C. *et al.* Diversification of memory B cells drives the continuous adaptation of secretory antibodies to gut microbiota. *Nature Immunology* **16**, 880–888 (2015).
412. Singh, K., Chang, C. & Gershwin, M. E. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmunity Reviews* **13**, 163–177 (2014).
413. Gorfu, G., Rivera-Nieves, J. & Ley, K. Role of  $\beta 7$  integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr Mol Med* **9**, 836–850 (2009).
414. Ericsson, A., Svensson, M., Arya, A. & Agace, W. W. CCL25/CCR9 promotes the induction and function of CD103 on intestinal intraepithelial lymphocytes. *European Journal of Immunology* **34**, 2720–2729 (2004).
415. Kilshaw, P. J. & Murant, S. J. Expression and regulation of  $\beta 7(\beta p)$  integrins on mouse lymphocytes: Relevance to the mucosal immune system. *European Journal of Immunology* **21**, 2591–2597 (1991).
416. Wagner, N. *et al.* Critical role for P7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. **382**, 5 (1996).
417. Lefrançois, L. *et al.* The Role of  $\beta 7$  Integrins in CD8 T Cell Trafficking During an Antiviral Immune Response. 8.
418. Berg, E. L. *et al.* u4p7 Integrin Mediates Lymphocyte Binding to the Mucosal Vascular Addressin MAdCAM-1. 11.
419. Rott, L. S. *et al.* Expression of mucosal homing receptor  $\alpha 4\beta 7$  by circulating CD4<sup>+</sup> cells with memory for intestinal rotavirus. *Journal of Clinical Investigation* **100**, 1204–1208 (1997).
420. Kunkel, E. J. *et al.* Lymphocyte CC Chemokine Receptor 9 and Epithelial Thymus-expressed Chemokine (TECK) Expression Distinguish the Small Intestinal Immune Compartment: Epithelial Expression of Tissue-specific Chemokines as an Organizing Principle in Regional Immunity. 7.
421. Papadakis, K. A. *et al.* CCR9-Positive lymphocytes and thymus-expressed chemokine distinguish small bowel from colonic Crohn's disease. *Gastroenterology* **121**, 246–254 (2001).
422. Onai, N. Pivotal role of CCL25 (TECK)-CCR9 in the formation of gut cryptopatches and consequent appearance of intestinal intraepithelial T lymphocytes. *International Immunology* **14**, 687–694 (2002).
423. Kim, S. V. *et al.* GPR15-Mediated Homing Controls Immune Homeostasis in the Large Intestine Mucosa. *Science* **340**, 1456–1459 (2013).
424. Habtezion, A., Nguyen, L. P., Hadeiba, H. & Butcher, E. C. Leukocyte Trafficking to the Small Intestine and Colon. *Gastroenterology* **150**, 340–354 (2016).
425. Jegodzinski, L. *et al.* The G Protein-Coupled Receptor (GPR) 15 Counteracts Antibody-Mediated Skin Inflammation. *Frontiers in Immunology* **11**, (2020).
426. Nguyen, L. P. *et al.* Role and species-specific expression of colon T cell homing receptor GPR15 in colitis. *Nature Immunology* **16**, 207–213 (2015).
427. Johansson-Lindbom, B. & Agace, W. W. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunological Reviews* **215**, 226–242 (2007).
428. Iwata, M. *et al.* Retinoic Acid Imprints Gut-Homing Specificity on T Cells. *Immunity* **21**, 527–538 (2004).
429. Stock, A., Napolitani, G. & Cerundolo, V. Intestinal DC in migrational imprinting of immune cells. *Immunology & Cell Biology* **91**, 240–249 (2013).
430. Jaensson, E. *et al.* Small intestinal CD103<sup>+</sup> dendritic cells display unique functional properties that are conserved between mice and humans. *Journal of Experimental Medicine* **205**, 2139–2149 (2008).
431. Dzutsev, A. *et al.* Differential T cell homing to colon vs. small intestine is imprinted by local CD11c<sup>+</sup> APCs that determine homing receptors. *Journal of Leukocyte Biology* **102**, 1381–1388 (2017).
432. Coombes, J. L. & Powrie, F. Dendritic cells in intestinal immune regulation. *Nature Reviews Immunology* **8**, 435–446 (2008).
433. Arihiro, S. *et al.* Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Pathology International* **52**, 367–374 (2002).
434. Villablanca, E. J., Cassani, B., von Andrian, U. H. & Mora, J. R. Blocking Lymphocyte Localization to the Gastrointestinal Mucosa as a Therapeutic Strategy for Inflammatory Bowel Diseases. *Gastroenterology* **140**, 1776–1784.e5 (2011).
435. Feagan, B. G. *et al.* Treatment of Active Crohn's Disease With MLN0002, a Humanized Antibody

- to the  $\alpha 4\beta 7$  Integrin. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* **6**, 1370–1377 (2008).
436. Zhang, X. *et al.* The oral and gut microbiomes are perturbed in rheumatoid arthritis and partly normalized after treatment. *Nature Medicine* **21**, 895–905 (2015).
437. Wu, H.-J. *et al.* Gut-Residing Segmented Filamentous Bacteria Drive Autoimmune Arthritis via T Helper 17 Cells. *Immunity* **32**, 815–827 (2010).
438. Kay, J. The role of interleukin-1 in the pathogenesis of rheumatoid arthritis. *Rheumatology* **43**, iii2–iii9 (2004).
439. Abdollahi-Roodsaz, S. *et al.* Stimulation of TLR2 and TLR4 differentially skews the balance of T cells in a mouse model of arthritis. *Journal of Clinical Investigation* **118**, 205–216 (2008).
440. Teng, F. *et al.* Gut Microbiota Drive Autoimmune Arthritis by Promoting Differentiation and Migration of Peyer’s Patch T Follicular Helper Cells. *Immunity* **44**, 875–888 (2016).
441. Krebs, C. F. *et al.* Autoimmune Renal Disease Is Exacerbated by S1P-Receptor-1-Dependent Intestinal Th17 Cell Migration to the Kidney. *Immunity* **45**, 1078–1092 (2016).
442. Kivisäkk, P., Tucky, B., Wei, T., Campbell, J. J. & Ransohoff, R. M. Human cerebrospinal fluid contains CD4<sup>+</sup> memory T cells expressing gut- or skin-specific trafficking determinants: relevance for immunotherapy. *BMC Immunol* **7**, 14 (2006).
443. Chen, J. *et al.* Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Scientific Reports* **6**, (2016).
444. Jangi, S. *et al.* Alterations of the human gut microbiome in multiple sclerosis. *Nature Communications* **7**, (2016).
445. Kadowaki, A., Saga, R., Lin, Y., Sato, W. & Yamamura, T. Gut microbiota-dependent CCR9<sup>+</sup>CD4<sup>+</sup> T cells are altered in secondary progressive multiple sclerosis. *Brain* **142**, 916–931 (2019).
446. Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y. & Mazmanian, S. K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 4615–4622 (2011).
447. Berer, K. *et al.* Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, 10719–10724 (2017).
448. Duc, D. *et al.* Disrupting Myelin-Specific Th17 Cell Gut Homing Confers Protection in an Adoptive Transfer Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Cell Reports* **29**, 378–390.e4 (2019).
449. Kuhbandner, K. *et al.* MAdCAM-1-Mediated Intestinal Lymphocyte Homing Is Critical for the Development of Active Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
450. Rojas, O. L. *et al.* Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell* **176**, 610–624.e18 (2019).
451. Haupteltshofer, S. *et al.* Smad7 in intestinal CD4<sup>+</sup> T cells determines autoimmunity in a spontaneous model of multiple sclerosis. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **116**, 25860–25869 (2019).
452. Schmitt, N. *et al.* Human Dendritic Cells Induce the Differentiation of Interleukin-21-Producing T Follicular Helper-like Cells through Interleukin-12. *Immunity* **31**, 158–169 (2009).
453. Weksler, B., Romero, I. A. & Couraud, P.-O. The hCMEC/D3 cell line as a model of the human blood brain barrier. *Fluids and Barriers of the CNS* **10**, 16 (2013).
454. Strazza, M., Maubert, M. E., Pirrone, V., Wigdahl, B. & Nonnemacher, M. R. Co-culture model consisting of human brain microvascular endothelial and peripheral blood mononuclear cells. *Journal of Neuroscience Methods* **269**, 39–45 (2016).
455. Fergusson, J. R., Fleming, V. M. & Klenerman, P. CD161-Expressing Human T Cells. *Frontiers in Immunology* **2**, (2011).
456. Lünemann\*, J. D. *et al.* Cross-sectional and longitudinal analysis of myelin-reactive T cells in patients with multiple sclerosis. *Journal of Neurology* **251**, 1111–1120 (2004).
457. Ponomarev, E. D. *et al.* GM-CSF Production by Autoreactive T Cells Is Required for the Activation of Microglial Cells and the Onset of Experimental Autoimmune Encephalomyelitis. *The Journal of Immunology* **178**, 39–48 (2007).
458. Zhu, S., Lin, J., Qiao, G., Wang, X. & Xu, Y. Tim-3 identifies exhausted follicular helper T cells in breast cancer patients. *Immunobiology* **221**, 986–993 (2016).
459. Wing, J. B. *et al.* A distinct subpopulation of CD25<sup>-</sup> T-follicular regulatory cells localizes in the germinal centers. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **114**, E6400–E6409 (2017).
460. Ritvo, P.-G. G. *et al.* Tfr cells lack IL-2R $\alpha$  but express decoy IL-1R2 and IL-1Ra and suppress the

- IL-1–dependent activation of Tfh cells. *SCIENCE IMMUNOLOGY* 12 (2017).
461. Tarasenko, T. N. *et al.* Cytochrome c Oxidase Activity Is a Metabolic Checkpoint that Regulates Cell Fate Decisions During T Cell Activation and Differentiation. *Cell Metabolism* **25**, 1254–1268.e7 (2017).
462. Iness, A. N. *et al.* The cell cycle regulatory DREAM complex is disrupted by high expression of oncogenic B-Myb. *Oncogene* **38**, 1080–1092 (2019).
463. Khaibullin, T. *et al.* Elevated Levels of Proinflammatory Cytokines in Cerebrospinal Fluid of Multiple Sclerosis Patients. *Frontiers in Immunology* **8**, (2017).
464. Mori, F. *et al.* RANTES correlates with inflammatory activity and synaptic excitability in multiple sclerosis. *Multiple Sclerosis Journal* **22**, 1405–1412 (2016).
465. Izikson, L., Klein, R. S., Charo, I. F., Weiner, H. L. & Luster, A. D. Resistance to Experimental Autoimmune Encephalomyelitis in Mice Lacking the Cc Chemokine Receptor (Ccr2). *Journal of Experimental Medicine* **192**, 1075–1080 (2000).
466. Gu, S. M. *et al.* CCR5 knockout suppresses experimental autoimmune encephalomyelitis in C57BL/6 mice. *Oncotarget* **7**, 15382–15393 (2016).
467. Pittaluga, A. CCL5–Glutamate Cross-Talk in Astrocyte-Neuron Communication in Multiple Sclerosis. *Frontiers in Immunology* **8**, (2017).
468. Schmitt, N., Bentebibel, S.-E. & Ueno, H. Phenotype and functions of memory Tfh cells in human blood. *Trends in Immunology* **35**, 436–442 (2014).
469. Hale, J. S. *et al.* Distinct Memory CD4<sup>+</sup> T Cells with Commitment to T Follicular Helper- and T Helper 1-Cell Lineages Are Generated after Acute Viral Infection. *Immunity* **38**, 805–817 (2013).
470. Kebir, H. *et al.* Preferential recruitment of interferon- $\gamma$ -expressing T<sub>H</sub> 17 cells in multiple sclerosis. *Annals of Neurology* **66**, 390–402 (2009).
471. Nishihara, H. *et al.* Human CD4<sup>+</sup> T cell subsets differ in their abilities to cross endothelial and epithelial brain barriers in vitro. *Fluids and Barriers of the CNS* **17**, (2020).
472. Christensen, J. R. *et al.* Systemic Inflammation in Progressive Multiple Sclerosis Involves Follicular T-Helper, Th17- and Activated B-Cells and Correlates with Progression. *PLoS ONE* **8**, e57820 (2013).
473. Westall, F. C. Molecular Mimicry Revisited: Gut Bacteria and Multiple Sclerosis. *Journal of Clinical Microbiology* **44**, 2099–2104 (2006).
474. Baniahmad, A. *et al.* The frequency of follicular T helper cells differs in acute and chronic neuroinflammation. *Scientific Reports* **10**, (2020).
475. Pröbstel, A.-K. *et al.* Gut microbiota–specific IgA<sup>+</sup> B cells traffic to the CNS in active multiple sclerosis. (2020).