



**HAL**  
open science

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

Adrien Duran

► **To cite this version:**

Adrien Duran. Pathogénicité des lymphocytes dérivés de l'intestin dans la sclérose en plaques. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2022. Français. NNT : 2022BORD0097 . tel-04578661

**HAL Id: tel-04578661**

**<https://theses.hal.science/tel-04578661>**

Submitted on 17 May 2024

**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 : Sciences de la Vie et de la Santé

SPÉCIALITÉ : Microbiologie-Immunologie

Par Adrien DURAN

**Pathogénicité des lymphocytes dérivés de l'intestin  
dans la sclérose en plaques**

Sous la direction de : Nathalie SCHMITT

Soutenue le 28 mars 2022

Membres du jury :

Mr	NOËL Thierry	PU, Université de Bordeaux	Président
Mme	MICHEL Laure	MCU-PH, Université de Rennes	Rapporteur
Mme	PICARD Capucine	PU-PH, Université de Paris	Rapporteur
Mr	DELOBEL Pierre	PU-PH, Université de Toulouse	Examineur
Mr	JAMIN Christophe	MCU-PH, Université de Bretagne Occidentale	Examineur

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

## Résumé :

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie auto-immune, inflammatoire chronique du système nerveux central. L'étiologie de la SEP est mal connue mais plusieurs facteurs, notamment génétiques et environnementaux, sont associés à une susceptibilité à la SEP. L'intestin, exposé au microbiote intestinal, représente une interface majeure des cellules immunitaires avec l'environnement. Des études chez l'Homme ont montré que la composition du microbiote intestinal était différente entre sujets sains et patients SEP. Chez le modèle murin de la SEP, il a été observé que la composition du microbiote intestinal influence le développement de la maladie. De plus, les plasmocytes sécréteurs d'immunoglobulines de type A (IgA), présents dans le liquide céphalo rachidien des patients présentant une SEP active, ont été montrés comme provenant majoritairement de l'intestin. Historiquement, un rôle des LB a été proposé dans la SEP suite à la découverte d'anticorps dans le liquide céphalo rachidien des patients SEP, témoignant d'une expansion des LB. Or, le succès récent des thérapies de déplétion des LB a mis en évidence un rôle des LB indépendant de la production d'anticorps dans la pathologie de la SEP. Dans ce contexte, nous nous intéressons aux lymphocytes B (LB) dérivant de l'intestin dans la pathogénicité de la SEP. Pour identifier les LB dérivant de l'intestin nous utilisons l'expression de l'intégrine  $\beta 7$ . En effet, l'expression de l'intégrine  $\beta 7$  est induite chez les lymphocytes naïfs au niveau de site inducteur de l'intestin. Une fois exprimée, les lymphocytes rejoignent alors la circulation sanguine pour finalement revenir dans l'intestin grâce au ligand de l'intégrine  $\beta 7$ , MADCAM, exprimé par les cellules endothéliales mucosales. L'expression de l'intégrine  $\beta 7$  par les lymphocytes dans le sang nous permet alors d'identifier les cellules dites « primées » dans l'intestin.

Nous avons tout d'abord étudié le phénotype de ces LB dérivant de l'intestin chez les sujets sains puisque leurs propriétés sont peu connues. Nous avons pu observer que les LB CD27+IgD+ dit marginaux  $\beta 7^+$  ont un profil plus inflammatoire comparé aux LB mémoires (CD27+IgD-) dérivés ou non de l'intestin et aux LB marginaux n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$ . En effet, les LB marginaux  $\beta 7^+$  sécrètent des niveaux de cytokines inflammatoires plus importants, notamment l'IL-6, le TNF $\alpha$  et la LT- $\alpha$ . De façon intéressante, cette population sécrète également plus d'IL-10, une cytokine régulatrice.

Dans un second temps, nous avons étudié les caractéristiques des LB chez les patients atteints de SEP. Nous avons deux séries d'expériences. Dans la première série d'expérience, nous avons pu observer que les LB CD27+ de certains patients SEP exprimaient plus d'IL-6 que les LB de donneurs sains comme précédemment décrit dans la littérature. Nous avons pu déterminer que cette augmentation était due à une proportion plus élevée de LB mémoires exprimant l'intégrine  $\beta 7^+$  capable de sécréter l'IL-6. Lors de la seconde série d'expérience, nous n'avons pas observé de différence entre les patients et les donneurs sains pour l'expression de l'IL-6, car, sans doute, les patients étudiés étaient sous immuno-modulateurs/immuno-suppresseurs et/ou ne présentaient pas une maladie active au moment des prélèvements.

En résumé, chez les sujets sains, les LB de l'intestin présentent un profil cytokinique, à la fois plus inflammatoire et régulateur, potentiellement dû à leur exposition au microbiote intestinal. Dans la SEP, nous avons pu observer que la plus forte expression d'IL-6 par les LB décrite dans la littérature provenait des LB  $\beta 7^+$ , suggérant que les LB dérivés de l'intestin pourraient devenir pathogénique dans la SEP, notamment en favorisant l'inflammation au niveau du système nerveux central.

**Mots clés :** Lymphocytes B intestinaux, intégrine  $\beta 7$ , sclérose en plaques

# Pathogenicity of gut-derived lymphocytes in multiple sclerosis

## Abstract :

Multiple sclerosis (MS) is a chronic inflammatory autoimmune disease of the central nervous system. The aetiology of MS is poorly understood but several factors, including genetic and environmental factors, are associated with susceptibility to MS. The gut, exposed to the intestinal microbiota, represents a major interface of immune cells with the environment. Studies in humans have shown that the composition of the gut microbiota is different between healthy subjects and MS patients. In the mouse model of MS, it has been observed that the composition of the gut microbiota influences the development of the disease. In addition, IgA-secreting B cells, present in the cerebrospinal fluid of patients with active MS, were found mainly originated from the intestine. In this context, we are interested in gut-derived B cells in the pathogenicity of MS. Historically, a role for B cells was proposed in MS following the discovery of antibodies in the cerebrospinal fluid of MS patients, as it indicates an abnormal expansion of B cells. However, the recent success of B cell depletion therapies has highlighted a role for B cells independent of antibody production in MS pathology. We therefore aimed at determining the role of gut-derived B cells in MS pathology. To identify gut-derived B cells we used integrin  $\beta 7$  expression. Indeed, the expression of integrin  $\beta 7$  is initiated in naive lymphocytes at the inducer site of the intestine. Once expressed, the lymphocytes then enter the bloodstream and finally return to the intestine via the integrin  $\beta 7$  ligand, MADCAM, expressed by mucosal endothelial cells. The expression of integrin  $\beta 7$  by lymphocytes in the blood then allows us to identify the cells primed in the gut.

We first studied the phenotype of these gut-derived B cells in healthy subjects in order to characterise them physiologically as they are poorly described in the literature. We were able to observe that CD27+IgD+ B cells, also known as  $\beta 7$ + marginal B cells, have a more inflammatory profile compared to the memory B cells (CD27+IgD-) derived or not from the intestine and the marginal B cells not expressing the  $\beta 7$  integrin. Indeed,  $\beta 7$ + marginal B cells secrete higher levels of inflammatory cytokines, notably IL-6, TNF $\alpha$  and LT- $\alpha$ . Interestingly, this population also secretes higher levels of the immuno-regulatory cytokine IL-10.

In a second step, we studied the characteristics of B cells in MS patients. We performed two sets of experiments. In the first set of experiments, we could observe that CD27+ B cells from some MS patients expressed more IL-6 than B cells from healthy donors as previously described. We determined that this higher secretion originates from  $\beta 7$ + memory B cells. In the second series of experiments, we did not observe any difference between patients and healthy donors for IL-6 expression, probably because the patients studied were on immunomodulators/immunosuppressants and/or did not have active disease at the time of the sampling.

In summary, in healthy subjects, B cells from the gut show both a more inflammatory and regulatory cytokine expression profiles, probably due to their exposure to the highly inflammatory environment of the intestine. In MS, we observed that the increased expression of IL-6 by B cells described in the literature is originated from  $\beta 7$ + B cells, suggesting that gut-derived B cells could be highly pathogenic in MS, notably by promoting inflammation in the central nervous system.

**Keywords :** Gut-derived B cells, integrin  $\beta 7$ , multiple sclerosis

# Remerciements

Je remercie le Dr. Laure Michel et le Pr. Capucine Picard d'avoir accepté d'être rapporteurs et d'évaluer mes travaux de thèse. Je remercie également le Pr. Thierry Noël d'avoir accepté de présider ce jury. Merci au Pr. Delobel Pierre et au Dr. Christophe Jamin d'avoir accepté d'être examinateurs de cette thèse.

Je remercie également les patients ainsi que le service de neurologie du CHU de Bordeaux pour nous avoir fourni de précieux prélèvements.

Merci à l'IDEX d'avoir financé mon projet de thèse.

\*\*\*

Je tiens à remercier chaleureusement ma directrice de thèse, Nathalie Schmitt. Merci pour ton encadrement et ton investissement depuis le master 2, ça n'a pas toujours été facile, tu as du me supporter pendant ces 4 années, mais j'ai énormément appris grâce à toi. Merci pour toutes ces discussions, sérieuses et moins sérieuses.

Merci au Dr. Julie Déchanet-Merville pour son accueil à ImmunoConcEpT.

Merci à tous les membres du laboratoire pour ces années avec vous. Plus particulièrement merci à Aurélie pour les discussions, les rigolades, et surtout pour tes gâteaux au yaourt qui sont délicieux. Merci à Séverine, notre minouche nationale, pour ton soutien, nos discussions, rigolades, engueulades et pour prendre aussi bien soin de nous. Merci pour tous ces moments, ça n'aurait pas été pareil sans toi. Tu n'aimes pas qu'on dise ça, mais t'es un vrai pilier pour nous. J'espère que la tradition des barbecues va continuer. Tu vas beaucoup me manquer. Merci à Dorothée, Maria et Mimi, pour nos discussions, de m'avoir écouté me plaindre, et de votre aide. Je tiens également à remercier Vincent et Atika pour votre aide au tri, vos conseils et votre écoute lors de ces moments et merci à Xavier pour ta pédagogie, nos discussions et de nous faire rire.

Je remercie également les membres de l'équipe, Anaëlle pour ton aide sur mon projet. Merci à Laura, ça a été un réel plaisir de t'accompagner durant ton stage de master, tu m'as beaucoup fait rire et j'espère que tu n'oublieras jamais la superbe « Ola » que tu as eu. Merci pour tes merveilleux gâteaux, tu as du talent. Merci à Iris, on n'aura pas passé beaucoup de temps ensemble mais c'était super. Merci pour ton

aide et ton implication, toi aussi tu m'as beaucoup fait rire. J'ai adoré discuter de foot avec toi, et n'oublie pas que le FC Barcelone reste la meilleure équipe du monde.

Je remercie également les autres doctorants du laboratoire notamment Hannah, Gaël et Damien pour votre bienveillance et votre aide lorsque j'en ai eu besoin. Merci à Sébastien pour ton soutien, nos discussions. C'est toujours un plaisir de prendre des pauses cafés avec toi. Merci à Amandine, camarade de bureau, de m'avoir supporté pendant tout ce temps, de m'avoir laissé râlé, je sais, j'ai été chiant avec toi mais qui aime bien châtie bien.

Merci aux M2, Agathe, Victor et Thomas, on a bien rigolé pendant votre stage, et je reste disponible pour tout apéro chez Victor !

Enfin, merci à mes copains, mes camarades, mes amis. Tous les moments passés avec vous étaient magique, je ressors de ces années avec énormément de souvenirs et j'espère qu'on continuera nos petites excursions. Merci à Andréo, pour ton soutien sans faille, je sais que je pourrais toujours compter sur toi et que tu me suivras si je te demande de prolonger l'abonnement canal ! Merci à Pao, j'espère un jour pouvoir venir te voir à NewYork et, te mettre une bonne branlée au Badminton, et te voir faire tes magnifiques imitations : « Bonjour, Monsieur Pujadas », « Au revoir ». Mercèèè à Gabs, alias Gorditoz pour nous avoir fourni tant de moments 0% drôles. Merci à Eleno, tu arriveras toujours à me surprendre ma coupine avec tes nombreuses Elenades. Merci à Nathalie, Yareb, t'es une personne formidable, l'une des plus généreuse que je connaisse. Tu m'as tellement fasciné pendant ces années, me faire rire à en pleurer, merci. Merci à Corentin, Kiiiiiiibe, depuis le master 2 dans le même bureau, t'es devenue un beauf frère ! Plus sérieusement, merci. Merci de m'avoir écouté, soutenu, j'ai bien du te faire chier à plusieurs reprises mais t'inquiètes pas que toi aussi ! Enfin, Merci à Mélanie, la grosse folle, depuis le master.. J'ai tellement de souvenirs avec toi.. Dès les premiers jours de stage à me bizuter avec les 100 aliquots sans que je les utilise après. C'était le début d'une merveilleuse amitié, en passant par tes foutages de gueules (trop nombreux) avec ton rire si communicatif. Plus sérieusement, c'est toi qui m'as formé, qui m'a transmis cette rigueur et je t'en serai toujours reconnaissant. J'ai passé des moments magnifiques avec toi, alors merci pour ces années. Plus généralement, mes coupains, je vous aime, je n'aurais pas réussi à tenir sans vous. Vous êtes importants pour moi et j'espère vous compter parmi mes amis pour la vie.

Merci à mes amis de Licence et de master. Tellement de souvenirs, de soirées passées avec vous.

A Yadaly, depuis le début des années Licence. Je me souviendrai toute ma vie de l'émotion qu'on a partagé sur ces marches du bâtiment 1A un certain mois de juillet 2018.

A Anto, de m'avoir enseigné la Savate Française, promis tes verres étaient vides. T'es un grand malade mec, et c'est pour ça qu'on t'aime.

A Ipoutcha, le sang, tellement de chose à dire sur toi. L'une des personnes les plus folles que je connaisse. Merci d'avoir été là depuis la licence 3. Merci, de nous avoir ouvert les portes de ton magnifique Pays Basque pour le week-end le plus important de l'année !

A Romain, la Sourbe, pour toutes tes punchlines depuis la licence 2. Un parieur hors pair, et j'espère qu'il y aura encore de nombreuses soirées avec toi.

A Karl, le canari parisien, débarqué en master 1. Tu t'es de suite intégré à nous, un feeling qui est passé merveilleusement bien dès le début, pour de nombreuses conneries avec toi. Par contre je suis désolé de te dire ça frérot, mais faut vraiment que tu fasses quelque chose avec Fifa..

A Gauthier, le plus fidèle compagnon. Licence 1 avec toi, cours d'anglais au fond de la salle, une complicité de fou qui aboutit à une coloc' ! C'était les meilleurs moments mec, et toujours amis. Pour la vie j'en suis sûr mon pote. Je sais que tu seras toujours là pour moi.

Un merci général à vous tous, les gars, tellement de moments, de soirées, surtout en master où je crois qu'on en a fait de sacrément belles ! Quand vous voulez je vous enseigne à tous la Savate française ! J'espère que vous n'oublierez jamais la Girouette Catalane, Visca Barça !

Merci aussi aux vieux du groupe MPG19, Fabien et Thomas. Vous êtes des génies les gars, j'espère qu'on fera à nouveaux des week-ends à Lacanau.

Je tiens également remercier les copains, les 8, les vrais. David, Enzo, Noémie, Nicolas, Romain, Pierrot, et Steven. Depuis la première, merci pour tout, les Fratt's. Quand est-ce qu'on retourne au banc pour des élections ? J'ai hâte d'être à la prochaine semaine copains. Mention spéciale pour Pierrot le sang, la galère. Un véritable soutien pendant cette thèse. Beaucoup de souvenirs avec toi, un vrai pilier pour moi lors de ton passage à Bordeaux, merci pour tout, mon pote.

A ma famille, mes parents, mes sœurs. Merci Papa et Maman. Merci de m'avoir laissé me tester, faire des conneries, j'ai dû vous inquiéter et j'en suis désolé. Je vous serai éternellement reconnaissant de l'éducation que j'ai reçue, j'ai énormément de chance, je le sais. Je vous aime. Merci à Clélia et Elodie, mes princesses, je suis fier de vous et de ce que vous devenez. Je vous aime mes sœurs d'amour. J'ai énormément de chance d'avoir cette magnifique famille.

Merci à Lolita, je t'aime à via.

Quand j'ai écrit ces lignes, je me suis rappelé pourquoi j'ai voulu faire de la science. Je penserai toujours à toi, mamie Chouchou.

# Table des matières

<b>TABLE DES ILLUSTRATIONS .....</b>	<b>1</b>
<b>ABREVIATIONS .....</b>	<b>3</b>
<b>CHAPITRE 1 : LES LYMPHOCYTES B .....</b>	<b>5</b>
<b>I- LE DEVELOPPEMENT DES LB DANS LA MOELLE OSSEUSE .....</b>	<b>5</b>
<b>II- MATURATION DES LB DANS LES ORGANES LYMPHOÏDES SECONDAIRES .....</b>	<b>6</b>
A) <i>La voie de maturation des LB naïfs .....</i>	<i>8</i>
1. Les premières étapes d'activation .....	8
2. La voie extra-folliculaire .....	8
3. La voie folliculaire.....	9
B) <i>Indépendant des LT CD4 : les LB de la zone marginale.....</i>	<i>13</i>
<b>III- LES FONCTIONS DES LYMPHOCYTES B.....</b>	<b>14</b>
A) <i>La sécrétion d'anticorps.....</i>	<i>15</i>
B) <i>Cellule présentatrice d'antigène .....</i>	<i>17</i>
C) <i>Sécrétion de cytokines inflammatoires .....</i>	<i>18</i>
D) <i>Sécrétion de cytokines régulatrices.....</i>	<i>18</i>
E) <i>Formation de centres germinatifs ectopiques.....</i>	<i>19</i>
<b>IV- IMPLICATION DES LYMPHOCYTES B DANS LES MALADIES AUTO-IMMUNES .....</b>	<b>19</b>
A) <i>Le lupus érythémateux systémique.....</i>	<i>19</i>
B) <i>La polyarthrite rhumatoïde.....</i>	<i>20</i>
C) <i>La sclérose en plaques .....</i>	<i>21</i>
<b>CHAPITRE 2 : LA SCLEROSE EN PLAQUES .....</b>	<b>22</b>
<b>I- HISTORIQUE DE LA SCLEROSE EN PLAQUES .....</b>	<b>22</b>
<b>II- LA SCLEROSE EN PLAQUES .....</b>	<b>23</b>
A) <i>Étiologie de la sclérose en plaques.....</i>	<i>25</i>
B) <i>Traitements .....</i>	<i>28</i>
C) <i>Physiopathologie de la sclérose en plaques .....</i>	<i>29</i>
1- <i>Modèle EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale .....</i>	<i>29</i>
2- <i>Migration des cellules du SI dans le SNC .....</i>	<i>30</i>
3- <i>Phase inflammatoire aiguë.....</i>	<i>32</i>
a) <i>Les cellules de l'immunité innée .....</i>	<i>33</i>
b) <i>Les LT CD4.....</i>	<i>34</i>
c) <i>Les LT CD8.....</i>	<i>35</i>
d) <i>Les lymphocytes B.....</i>	<i>36</i>
i. <i>Les anticorps.....</i>	<i>37</i>
ii. <i>Cellules présentatrices d'antigènes .....</i>	<i>39</i>
iii. <i>Sécrétion de cytokines.....</i>	<i>40</i>
4- <i>Phase inflammatoire chronique .....</i>	<i>42</i>



a) Les centres germinatifs ectopiques dans la SEP .....	43
b) Les lymphocytes B.....	44
5- Les LT folliculaires auxiliaires dans la SEP .....	45
<b>CHAPITRE 3 : LE MICROBIOTE INTESTINAL DANS LA SEP .....</b>	<b>48</b>
<b>I- RELATION ENTRE LE MICROBIOTE INTESTINAL ET LES CELLULES DU SYSTEME IMMUNITAIRE 50</b>	
A) Généralités sur l'organisation des GALT.....	50
B) Communication entre le microbiote intestinal et les cellules immunitaires des GALT .....	51
C) Identification des lymphocytes intestinaux : le « gut homing ».....	54
D) Implication des lymphocytes intestinaux dans des pathologies .....	58
1. Implication des lymphocytes intestinaux dans le cancer : succès des immunothérapies	58
2. Implication des lymphocytes intestinaux dans les maladies auto-immunes.....	59
a) Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin .....	59
b) La polyarthrite rhumatoïde .....	60
<b>II- IMPLICATION DES LYMPHOCYTES INTESTINAUX DANS LA SCLEROSE EN PLAQUES .....</b>	<b>61</b>
<b>PROBLEMATIQUE ET HYPOTHESES .....</b>	<b>64</b>
<b>OBJECTIFS DE LA THESE.....</b>	<b>66</b>
<b>PROJET 1 : ROLE DES LYMPHOCYTES B DERIVES DE L'INTESTIN DANS LA PATHOGENICITE DE LA SEP.</b>	
.....	67
MATERIELS ET METHODES .....	68
RESULTATS .....	75
<b>PROJET 2 : LE PROFIL TH1/TH17 INDUIT CHEZ LES PATIENTS SEP SOUS NATALIZUMAB EST</b>	
<b>RESTREINT AUX LT CD4 MEMOIRES EXPRIMANT L'INTEGRINE <math>\beta</math>7.....</b>	<b>100</b>
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>102</b>
<b>CONCLUSION GENERALE .....</b>	<b>152</b>
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>155</b>

# Table des illustrations

<b>Figure 1</b> : Les différentes étapes du développement des lymphocytes B. D'après Sanz et al., 2019 <sup>8</sup> .....	7
<b>Figure 2</b> : Formation du centre germinatif. D'après De Silva et Klein, 2015 <sup>10</sup> .....	10
<b>Figure 3</b> : Sélection des LB par les TFh au sein du centre germinatif. D'après Kurosaki et al., 2015 <sup>20</sup> .....	12
<b>Figure 4</b> : Anatomie de la rate. D'après Pillai et Cariappa, 2009 <sup>25</sup> .....	14
<b>Figure 5</b> : Structure des anticorps. D'après Hansel et al., 2010 <sup>43</sup> .....	16
<b>Figure 6</b> : Les différentes formes cliniques de la SEP.....	25
<b>Figure 7</b> : Migration des cellules immunitaires dans le SNC d'après Furtado et. al, 2018 <sup>127</sup> et Prinz et Priller, 2017 <sup>128</sup> .....	31
<b>Figure 8</b> : Immunopathologie de la SEP dans le SNC en phase inflammatoire aigüe d'après Afzal et al. 2020 <sup>172</sup> .....	36
<b>Figure 9</b> : Les rôles proposés des LB dans la SEP.....	42
<b>Figure 10</b> : Les voies de communications entre le microbiote intestinal et le cerveau. D'après Cryan et al, 2020 <sup>247</sup> .....	49
<b>Figure 11</b> : Structure du système immunitaire intestinal. D'après Burgueño et Abreu, 2020 <sup>248</sup> . .....	51
<b>Figure 12</b> : Communication entre le microbiote intestinal et les cellules immunitaires. D'après Uribe-Herranz et al, 2021 <sup>270</sup> .....	54
<b>Figure 13</b> : Génération du "gut homing" par les cellules dendritiques. D'après Adams et Eksteen, 2006 <sup>280</sup> .....	57
<b>Figure 14</b> : Dysbiose dans le développement de pathologies.....	58
<b>Figure 15</b> : Hypothèse sur l'implication des lymphocytes B dérivés de l'intestin dans la pathogénicité de la SEP. ....	65
<b>Figure 16</b> : La proportion de LB CD27+IgD+ est plus importante dans le compartiment intégrine $\beta 7+$ que dans le compartiment intégrine $\beta 7-$ chez les donneurs sains. ....	76
<b>Figure 17</b> : L'expression des molécules de co-stimulations CD40 et HLA-DR est similaire à la surface des LB CD27+IgD- et CD27+IgD+ exprimant ou non l'intégrine $\beta 7$ chez les donneurs sains. ....	78
<b>Figure 18</b> : Les LB CD27+IgD- intestinaux (Int. $\beta 7+$ ) sécrètent moins d'IgG et plus d'IgA2 comparé à leurs équivalents n'exprimant pas l'intégrine $\beta 7$ chez les donneurs sains.....	81

<b>Figure 19 :</b> Les LB CD27+IgD- et CD27+IgD+ provenant de l'intestin restimulés par des TFh se différencient moins efficacement en plasmocytes que leurs homologues intégrine $\beta$ 7- mais secrètent de plus importantes quantités d'IgA chez les donneurs sains. ....	84
<b>Figure 20 :</b> Les LB CD27+IgD+ et les LB CD27+IgD- dérivés de l'intestin (intégrine $\beta$ 7+) secrètent des quantités plus importantes de cytokines inflammatoires et régulatrices que leurs homologues n'exprimant pas l'intégrine $\beta$ 7 chez les donneurs sains. ....	86
<b>Figure 21 :</b> Expression différentielle de gènes impliqués dans des voies de signalisation entre les LB CD27+IgD- dérivés ou non de l'intestin chez les donneurs sains. ....	88
<b>Figure 22 :</b> Expression différentielle de gènes impliqués dans des voies de signalisation entre les LB CD27+IgD+ dérivés ou non de l'intestin chez les donneurs sains. ....	89
<b>Figure 23 :</b> La proportion de LB CD27+IgD+ et de LB CD27+IgD- dans le compartiment intégrine $\beta$ 7 est similaire chez les patients SEP et les donneurs sains. ....	91
<b>Figure 24 :</b> Une plus forte proportion de LB CD27+IgD- dérivés de l'intestin exprime des IgA à leurs surfaces chez les patients avec une SEP progressive par rapport aux donneurs sains. .	92
<b>Figure 25 :</b> L'augmentation du pourcentage de LB exprimant l'IL-6 décrite en phase RRMS est particulièrement marquée dans les LB CD27+ exprimant l'intégrine $\beta$ 7. ....	94
<b>Figure 26 :</b> Le profil de sécrétion cytokinique des LB CD27+IgD+ exprimant l'intégrine $\beta$ 7 ne semble pas être altéré chez les patients SEP en phase RRMS.....	96
<b>Figure 27 :</b> Les LB CD27+ dérivés ou non de l'intestin polarisent différemment les LT CD4 naïfs et mémoires chez les donneurs sains. ....	98
<b>Tableau 1 :</b> Données cliniques des patients SEP (ND, non déterminé ; * patients utilisés pour l'étude du profil cytokinique des LB). ....	99

# Abréviations

AID	Activation induced deaminase
ALCAM	Activated leukocyte cell adhesion molecule
ARN	Acide ribonucléique
BCR	B cell receptor
BHE	Barrière hémato-encéphalique
BHM	Barrière hémato-méningée
CD	Maladie de Crohn
CIS	Syndrome clinique isolé
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'antigène
DC	Cellule dendritique
DZ	Zone sombre
EAE	Encéphalomyélite auto-immune expérimentale
EBNA	Antigènes nucléaires de l'EBV
EBV	Epstein-Barr virus
EDSS	Expanded disability status scale
ELS	Centre germinatif ectopique
FDC	Cellule dendritique folliculaire
FMT	Transfert de matières fécales
GALT	Tissus lymphoïdes associés à l'intestin
GC	Centre germinatif
GF	Germ free
GPR15	G-protein-coupled-receptor
GWAS	Genome-wide association studies
HC	Chaîne lourde
HEV	High endothelial venules
IBD	Maladies inflammatoires chroniques de l'intestin
ICAM	Intracellular adhesion molecule
Ig	Immunoglobuline
ILF	Follicules lymphoïdes isolés
IRM	Imagerie à résonance magnétique
LB	Lymphocyte B
LB MZ	Lymphocyte B de la zone marginale
LC	Chaîne légère
LCR	Liquide céphalo-rachidien
LFA-1	Lymphocyte function associated molecule
LT CD4	Lymphocytes T CD4
LZ	Zone claire
MAdCAM-1	Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1
MBP	Myelin binding protein
MLN	Ganglions mésentériques

MOG	Myelin oligodendrocyte glycoprotein
OSE	Opticospinal encephalomyelitis
PAR	Polyarthrite rhumatoïde
PBMC	Peripheral blood mononuclear cell
PD-L1	Programme cell death 1 ligand
PD1	Programme cell death 1
pIgR	Polymeric immunoglobulin receptor
PLP	Protéine protéolipidique
PNA <sub>d</sub>	Peripheral lymph node addressin
PP	Plaques de Peyer
PPMS	Sclérose en plaques premièrement progressive
PRR	Pattern recognition receptors
PSA	Polysaccharide A
PSGL-1	P-selectin glycoprotein ligand
RA	Acide rétinoïque
RALDH	Retinal dehydrogenase
RRMS	Sclérose en plaques récurrente-rémittente
SAA	Serum amyloid A
SEB	Entérotoxine B staphylococcique
SEP	Sclérose en plaques
SFB	<i>Segmented filamentous bacteria</i>
SHM	Hypermutation somatique
SLE	Lupus érythémateux systémique
SLO	Organe lymphoïde secondaire
SNC	Système nerveux central
SPMS	Sclérose en plaques secondairement progressive
TAC1	Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin-ligand interactor
TFh	Lymphocyte T auxiliaire folliculaire
Treg	Lymphocyte T régulateur
VCAM	Vascular cell adhesion molecule
VLA-4	Very late antigen

# Chapitre 1 : Les Lymphocytes B

Les lymphocytes B (LB) appartiennent à la réponse immunitaire adaptative et sont des acteurs majeurs dans la défense de l'organisme contre des pathogènes. Ils sont responsables de la réponse humorale grâce à la production d'immunoglobulines (Ig). Cependant, les LB sont également impliqués dans la réponse immunitaire via des fonctions indépendantes de la sécrétion d'anticorps : la présentation de l'antigène notamment à des lymphocytes T (LT), la production de cytokines inflammatoires et régulatrices agissant notamment sur les LT. Les LB sont aussi impliqués dans la formation de centres germinatifs (GC) dans les organes lymphoïdes secondaires (SLO) ainsi que dans des tissus non-lymphoïdes, on parle alors de centres germinatifs ectopiques.

## I- Le développement des LB dans la moelle osseuse

Le développement des LB a lieu dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. La première étape du processus de développement va être la différenciation de cette cellule souche en cellule lymphoïde progénitrice. La cellule lymphoïde va donner le premier précurseur des LB, la cellule pré-pro-B. Le microenvironnement de la moelle osseuse et notamment la présence de cellules stromales est nécessaire pour le développement des LB<sup>1</sup>. Les cellules stromales vont fournir des signaux nécessaires au développement des LB particulièrement via la sécrétion de CXCL12 pour les maintenir dans la moelle osseuse et d'IL-7 pour leur différenciation. Tout au long du développement, les cellules B seront plus au moins sensibles au gradient de cytokines produites par les cellules stromales.

Les différentes étapes du développement des LB seront marquées par l'expression et le réarrangement des gènes des immunoglobulines du récepteur à l'antigène des LB, le BCR (« B cell receptor »). Les immunoglobulines sont composées de chaînes lourdes H et de chaînes légères L, qui sont elles-mêmes constituées de segments VDJ et VJ respectivement. Les mécanismes de réarrangement du BCR font intervenir les enzymes RAG1 et RAG2 qui interagissent avec l'ADN pour initier le réarrangement génique<sup>1-3</sup>. La première étape du réarrangement des Ig se fait au sein de la cellule pro-B et consiste au réarrangement des segments D et J de la chaîne lourde puis du segment V avec la section DJ réarrangée. On est alors au stade de cellule pré-B. Il y a donc l'expression d'une chaîne lourde ainsi que

l'expression d'une chaîne légère de substitution pour former le pré-BCR. Le réarrangement va ensuite concerner la chaîne légère afin d'exprimer un BCR fonctionnel et ainsi arriver au stade de LB immature.

Maintenant que les LB ont un BCR fonctionnel, leur réactivité contre des molécules du soi va être testée afin de prévenir la production de LB auto-réactifs. Les LB qui réagissent contre les protéines du soi vont subir différents mécanismes d'éliminations ou de corrections. En effet, ils peuvent être éliminés par apoptose, on parle alors de délétion clonale. Ils peuvent également devenir anergique ne répondant plus à aucun stimuli. Enfin, ils peuvent subir un autre réarrangement génique en réactivant les enzymes RAG1 et RAG2 afin de ne plus réagir contre les antigènes du soi, on parle ici d'édition du récepteur. Cependant, ces mécanismes n'étant pas parfait, quelques LB auto-réactifs échapperont à ces processus et rejoindront la circulation<sup>4</sup>.

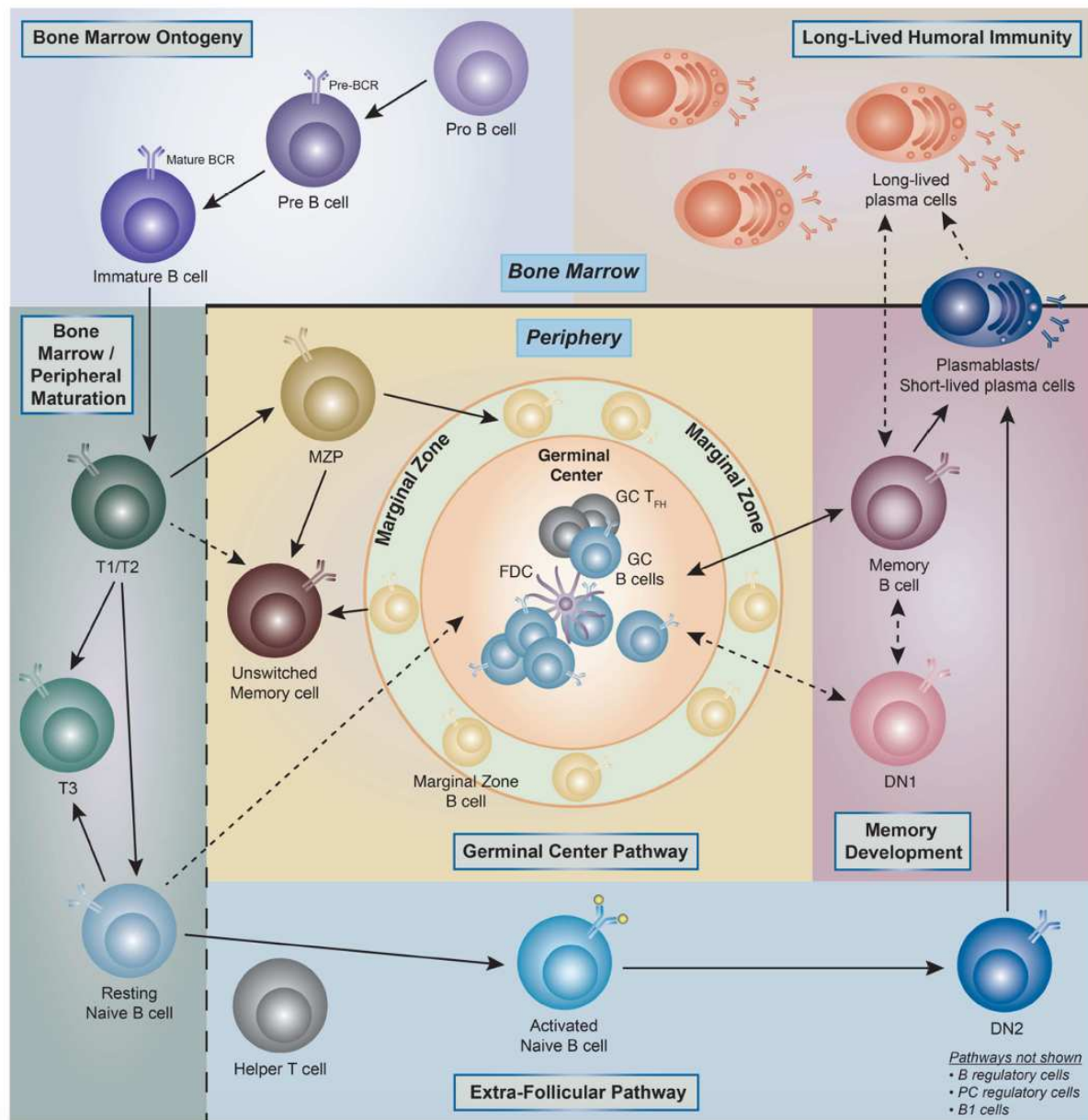
Au terme de ces étapes, les LB immatures expriment un BCR avec une Ig de type IgM et peuvent maintenant sortir de la moelle osseuse et rejoindre la circulation lymphatique et sanguine pour poursuivre leur maturation au sein des SLO.

## II- Maturation des LB dans les organes lymphoïdes secondaires

Les LB immatures qui transitent de la moelle osseuse aux SLO sont également définis comme des LB transitionnels. Il existe deux populations, les LB transitionnels T1 et T2<sup>5</sup> qui sont définis en fonction de leur phénotype. Les LB T1 sont CD19+, CD38+, CD24<sup>fort</sup>, CD21<sup>faible</sup>, CD23<sup>faible</sup>, IgM<sup>fort</sup>, IgD<sup>faible</sup>. Les LB arrivent dans les SLO avec un profil T1 et vont subir un contrôle de reconnaissance antigénique du soi<sup>6</sup>. Les LB non réactifs vont se différencier en LB T2 et vont finir leur maturation au sein du SLO. Les T2 diffèrent phénotypiquement des T1 par une plus forte expression de CD21, de CD23 et de l'IgD. Une autre population de LB transitionnels les LB T3 existe mais leur fonction est inconnue. Chez les souris, il a été proposé que ces cellules seraient la partie de LB anergiques ou des précurseurs de la voie des LB naïfs<sup>7</sup>.

Le LB T2 a deux choix possibles pour poursuivre sa maturation, il va entrer soit dans la voie de génération LB de la zone marginale soit dans la voie des LB naïfs. La voie de la zone marginale va donner les LB de la zone marginale impliqués dans les réponses indépendantes de l'aide des LT CD4. La voie des LB naïfs va permettre la différenciation des LB en LB

mémoires et plasmocytes au sein des follicules des SLO ou à l'extérieur des follicules de façon T-dépendante (**Figure 1**).



**Figure 1 : Les différentes étapes du développement des lymphocytes B. D'après Sanz et al., 2019<sup>8</sup>.**

Le développement des LB débute dans la moelle osseuse à partir de cellules souches hématopoïétiques. Au fur et à mesure du réarrangement des gènes du BCR, le LB va passer du stade pro-B à pré-B pour aboutir au stade LB immature exprimant une IgM de surface. Les LB vont alors rejoindre la périphérie pour atteindre la rate ou d'autres SLO. Les LB sont dit transitionnels et passent du stade T1 au stade T2. Le LB T2 peut alors se différencier en LB naïf ou en LB de la zone marginale. Les LB naïfs vont continuer leur maturation dans le centre germinatif à l'aide des LT CD4 présents pour devenir des LB mémoires ou des plasmocytes. Les LB naïfs peuvent aussi choisir de se développer à l'extérieur des follicules pour se différencier en plasmocytes à courte durée de vie. Les LB de la zone marginale vont continuer leur maturation dans la zone marginale des SLO.



## A) La voie de maturation des LB naïfs

Les LB naïfs sont des LB n'ayant pas encore rencontrés leur antigène. Les LB naïfs peuvent circuler à travers la circulation sanguine et les SLO pour rencontrer leur antigène. Ils vont poursuivre leur maturation soit dans les follicules des SLO, on parle de LB folliculaires, soit à l'extérieur des follicules, ce sont des LB extra-folliculaires. Les LB extra-folliculaires se différencieront en plasmocytes à courte durée de vie, tandis que les LB folliculaires vont se différencier en LB mémoires et plasmocytes à longue durée de vie. La différenciation des LB naïfs fait intervenir des LT CD4 folliculaires (TFh) qui sont un sous-type de LT CD4 spécialisé dans l'aide aux LB. Ils sont notamment présents au niveau des centres germinatifs des SLO où ils expriment le facteur de transcription Bcl-6 ainsi que CXCR5 leur permettant de répondre au gradient de la chimiokine CXCL13<sup>9</sup>.

### 1. Les premières étapes d'activation

Plusieurs acteurs immunitaires vont activer les LB naïfs, notamment les cellules dendritiques folliculaires (FDC) et les macrophages. Ces cellules vont présenter aux LB naïfs l'antigène directement à leur surface cellulaire ou sous forme de complexe immun. Le LB naïf va alors migrer à la périphérie du follicule, au niveau de la zone T pour y rencontrer un pré-TFh préalablement activé par les cellules dendritiques. Le pré-TFh est présent grâce à un gradient de CXCL13, et l'interaction des pré-TFh avec les LB naïfs entraîne leur prolifération. La majorité des LB ayant interagi avec les pré-TFh va entrer dans la réaction du centre germinatif (voie folliculaire). Les LB ne rentrant pas dans la réaction du GC vont poursuivre leur maturation à l'extérieur des follicules (voie extrafolliculaire).

### 2. La voie extra-folliculaire

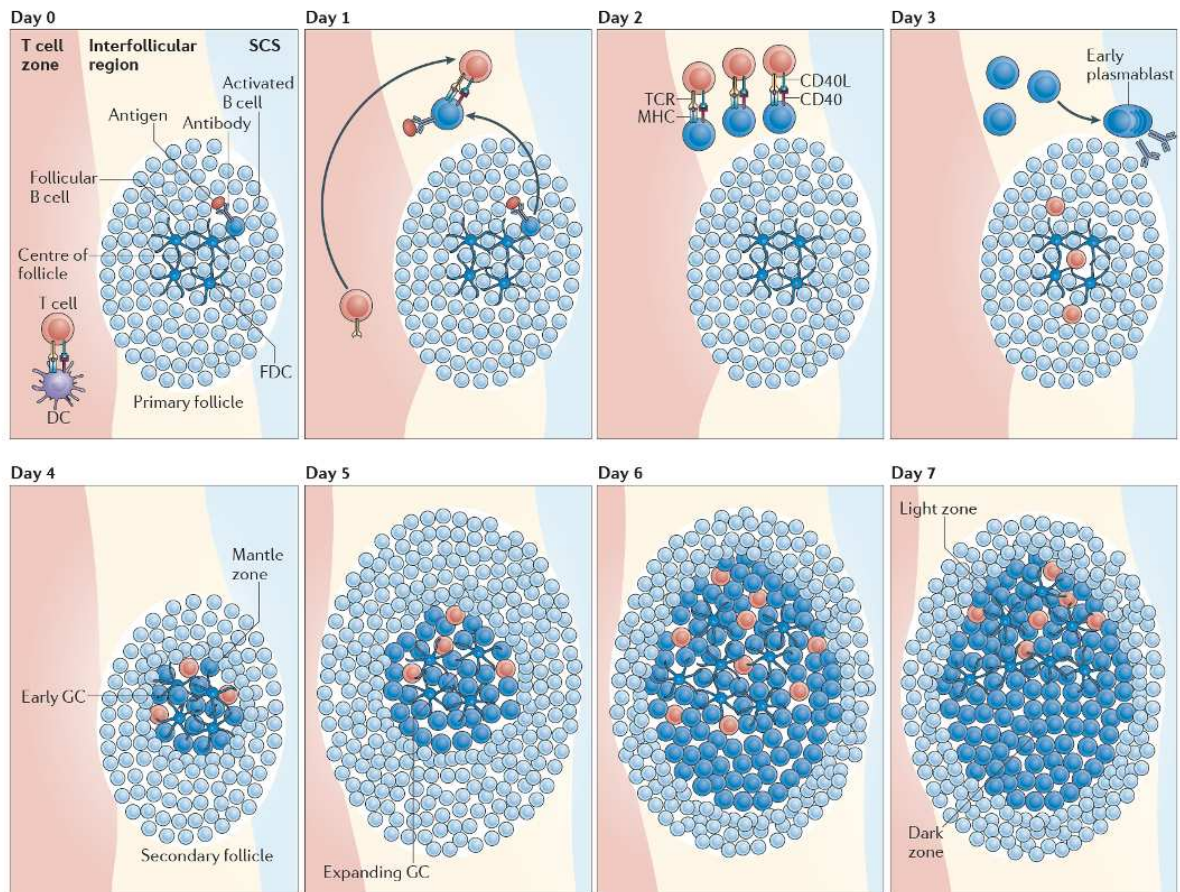
Des LB activés par les pré-TFh empruntant la voie extrafolliculaire vont se différencier en LB mémoires ou en plasmocytes à courte durée de vie<sup>10</sup>. Les plasmocytes à courte durée de vie constituent une première ligne de défense en produisant notamment des IgM de faibles affinités contre des pathogènes permettant une première réponse rapide bien que peu spécifique<sup>10</sup>. Ces plasmocytes ont une durée de vie de seulement quelques jours et peuvent subir un faible taux d'hypermutations somatiques juste après leur rencontre avec l'antigène<sup>11</sup>.

### 3. La voie folliculaire

L'interaction entre les LB et les pré-TFh à la frontière de la zone T-B permet aux pré-TFh d'acquérir leur phénotype de TFh et de migrer dans le follicule. Les LB activés vont ensuite migrer à leur tour dans le follicule. La migration des LB et des TFh activés va initier la conversion du follicule primaire en centre germinatif. Au sein du centre germinatif, les LB et les TFh vont proliférer pendant plusieurs jours jusqu'à la polarisation du centre germinatif en deux zones : la zone claire (LZ) et la zone sombre (DZ) (**Figure 2**). Le centre germinatif est alors dit mature. Les LB vont circuler entre la LZ et la DZ entraînant des cycles de maturations aboutissant à la sélection de LB de très hautes affinités qui se différencieront en LB mémoires ou en plasmocytes à longue durée de vie. Les cycles de maturations des LB au niveau des centres germinatifs reposent sur les mécanismes d'hypermutation somatique (SHM) au sein de la DZ et de commutation de classe dans la LZ<sup>12</sup>.

La SHM est un processus qui consiste à la mutation de la région V des chaînes lourdes et légères du BCR pour sa diversification modifiant ainsi la spécificité et l'affinité du BCR pour l'antigène donné, on parle de maturation d'affinité. Ce processus a lieu dans la DZ et implique l'enzyme AID (« activation induced deaminase »). Cette enzyme remplace une cytosine par un uracile induisant des mutations dans la séquence d'ADN qui peuvent augmenter l'affinité et la spécificité de liaison à l'antigène mais également induire des LB auto-réactifs qui seront éliminés par apoptose<sup>13</sup>.

L'enzyme AID est également impliquée dans le mécanisme de commutation de classe qui prend place dans la LZ et consiste au remplacement de la région constante des Ig constituant le BCR<sup>13</sup>. L'IgM sera alors remplacée par une IgG, IgA ou IgE. Ces Ig ont des spécificités différentes dans l'élimination du pathogène, la commutation de classe est donc un mécanisme qui permet également d'augmenter la diversité de la réponse des LB.



**Figure 2 : Formation du centre germinatif. D'après De Silva et Klein, 2015<sup>10</sup>.**

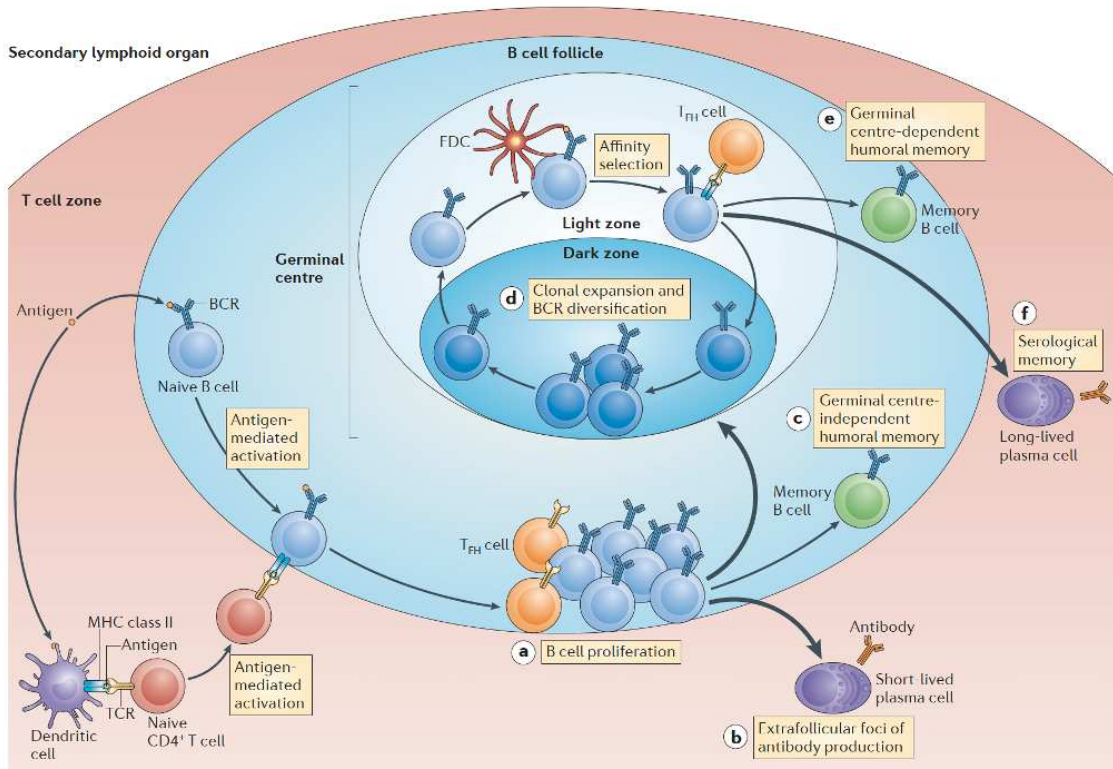
Les LB sont premièrement activés par la reconnaissance de leur antigène présenté notamment par les cellules dendritiques folliculaires ou les macrophages. Ils vont ensuite rencontrer, au niveau de la région interfolliculaire, un pré-TFh préalablement activé par une cellule dendritique. Après contact avec les LB, le pré-TFh migrent dans les follicules. Les LB migrent ensuite dans le follicule primaire initiant ainsi sa conversion en centre germinatif. Après plusieurs étapes de proliférations des LB, deux zones distinctes se constituent : la zone claire (LZ) et la zone sombre (DZ). La DZ contient les centroblastes qui prolifèrent et subissent la SHM, tandis que la LZ contient des cellules dendritiques folliculaires et des TFh qui vont être primordiaux pour sélectionner des LB de haute affinité et pour la différenciation des LB en LB mémoires et plasmocytes.

La DZ est donc le lieu où les LB subissent la SHM. La DZ est caractérisée par une concentration importante de LB appelés centroblastes qui prolifèrent et expriment CXCR4. Le ligand de CXCR4, CXCL12, est présent dans la DZ permettant la rétention des LB dans ce compartiment. Les LB migreront ensuite dans la LZ grâce à l'expression de CXCR5 en suivant un gradient de CXCL13 produit dans la LZ où les LB sont également appelés centrocytes<sup>14</sup>. Dans la LZ, les centrocytes ont un phénotype activé avec notamment l'expression de CD86, une molécule de co-stimulation impliquée dans l'interaction LT/LB. La LZ est moins dense que la DZ en LB et contient une part importante de FDC et de TFh. Les TFh vont sélectionner les LB les plus affins et spécifiques d'un antigène donné (**Figure 3**). Au niveau de la LZ, les LB présentent l'antigène au TFh via le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe

Il entraînant une compétition entre les LB pour pouvoir présenter l'antigène aux TFh. En retour, les TFh vont fournir des signaux de survie et de prolifération aux LB qui vont alors migrer à nouveau dans la DZ pour proliférer et subir d'autres SHM. Le LB muté retournera dans la zone claire et présentera à nouveau l'antigène aux TFh pour aboutir à un BCR muté de plus en plus affin pour l'antigène. Le TFh va donc sélectionner des LB de très haute affinité pour l'antigène et les moins spécifiques ne recevront pas de signaux de survie, entraînant leur mort par apoptose<sup>9</sup>. Il a été suggéré que les TFh peuvent participer à l'élimination des LB moins affins et auto-réactifs via l'axe FAS/FASL<sup>15</sup>.

Les TFh apportent leur aide aux LB via l'expression de molécules de surface notamment CD40L, PD-1, ICOS ainsi que par la sécrétion de facteurs solubles dont les cytokines IL-21 et l'IL-4. Ces signaux sont importants pour la survie, la prolifération et la différenciation des LB mais également pour la commutation de classe des Ig<sup>9</sup>. Les TFh produisent CXCL13 et participent donc à la rétention des LB dans la LZ. Par ailleurs, les TFh et les LB vont s'entraider mutuellement via l'interaction avec des molécules de co-stimulations. La liaison de ICOSL, exprimé par les LB, avec ICOS, exprimé par les TFh, entraîne une augmentation de l'expression de CD40L par les TFh qui se lie à CD40 sur les LB. Cette boucle de régulation positive favorise ainsi le maintien du contact T/B<sup>12</sup>. Ce contact cellulaire va permettre aux TFh de sécréter des molécules importantes pour la survie des LB tel que l'IL-4, l'IL-21 et BAFF. BAFF produit par les TFh est nécessaire pour la survie des LB affichant une haute affinité pour l'antigène<sup>16</sup>. L'IL-21 est impliquée dans la commutation de classe ou switch isotypique des Ig des LB, en favorisant notamment le switch vers la production d'IgG et d'IgA<sup>17</sup>. L'IL-4, en agissant en synergie avec l'IL-21 est impliquée dans le switch isotypique vers la production d'IgG et d'IgE<sup>18</sup>. De plus, l'IL-21 joue un rôle clé dans l'induction de la différenciation des LB en plasmocytes notamment en favorisant l'expression du facteur de transcription Blimp-1 via l'activation de STAT3<sup>19</sup>.

Concernant la différenciation en LB mémoire, une hypothèse serait que, au niveau de la LZ, les LB, avec un BCR moins affin, ne recevraient pas de signaux de différenciation en plasmocytes et se différencieraient alors en LB mémoires<sup>20</sup>. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour confirmer cette hypothèse. En fonction de l'environnement du centre germinatif, les LB vont donc se différencier en plasmocytes à longue durée de vie ou en LB mémoires.



**Figure 3 : Sélection des LB par les TFh au sein du centre germinatif. D'après Kurosaki et al., 2015<sup>20</sup>.**

Les LB naïfs, vont rencontrer leur antigène présenté par les cellules dendritiques folliculaires ou par des macrophages. Une fois activés, ils rejoignent au niveau de la bordure T-B les pré-TFh parallèlement activés par des cellules dendritiques. Les LB vont alors proliférer et la plupart vont rentrer dans la réaction du centre germinatif. Au niveau de la DZ, les LB vont subir plusieurs étapes de diversification de leur BCR via les SHM. Les LB vont alors migrer au sein de la LZ pour présenter l'antigène aux TFh qui vont les sélectionner en fonction de leur affinité pour l'antigène. Les LB peuvent alors subir une commutation de classe ou bien retourner dans la DZ pour avoir un BCR encore plus affiné. Les TFh vont induire la différenciation des LB en LB mémoires ou en plasmocytes à longue durée de vie. Après leur interaction avec les Pré-TFh à la bordure T-B, et une partie des LB ne va pas entrer dans la réaction du centre germinatif. Ces LB extra-folliculaires, vont se différencier rapidement en plasmocytes à courte durée de vie ou en LB mémoires.

Une fois la différenciation terminée, les plasmocytes et LB mémoires vont quitter les centres germinatifs. Les plasmocytes différenciés vont quitter les SLO pour rejoindre notamment la moelle osseuse qui constitue une véritable niche pour les plasmocytes avec de nombreux signaux de survie tel que CXCL12, l'IL-6, BAFF et APRIL<sup>11</sup>. Ces plasmocytes produisent constamment des anticorps contre leur antigène, conférant une protection de haute affinité et de longue durée<sup>21</sup>. Les LB mémoires, quant à eux, vont patrouiller entre la circulation sanguine et les SLO pour rencontrer leur antigène. Ce sont des cellules à très longue durée de vie qui permettent de répondre rapidement à une seconde infection par un pathogène en se différenciant en plasmocytes sécréteurs d'anticorps ou en initiant une nouvelle réaction du centre germinatif<sup>20,22</sup>.

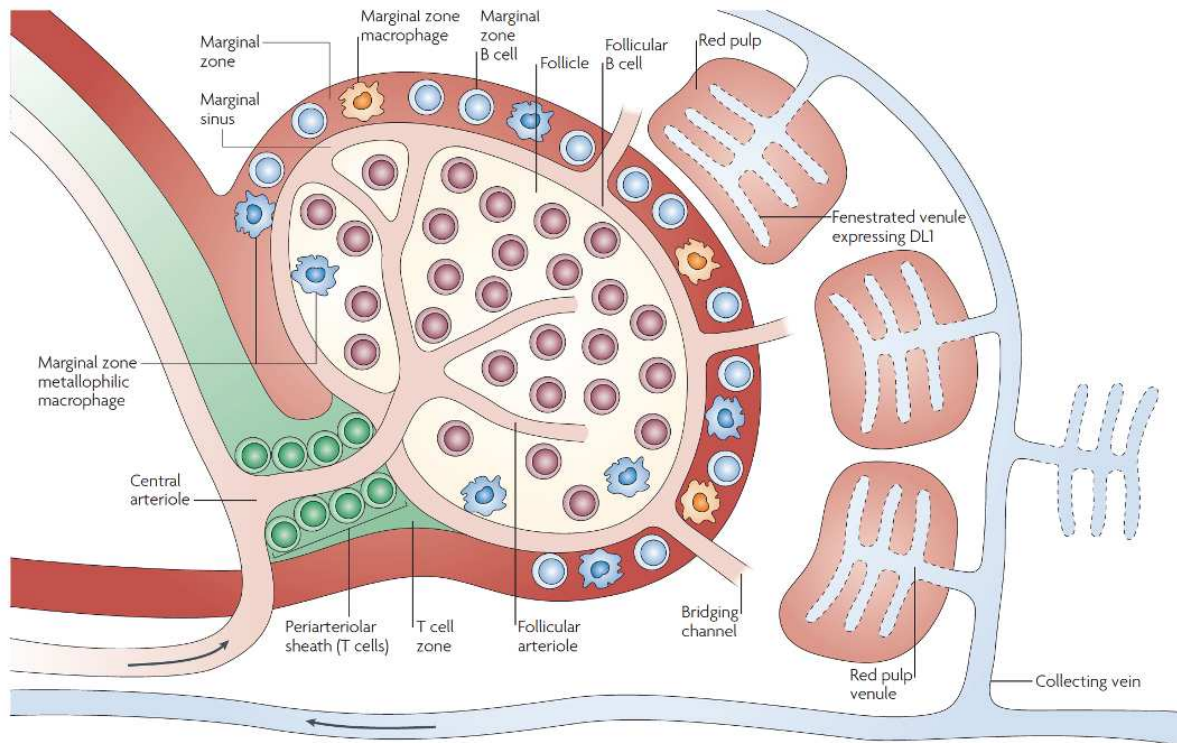
## B) Indépendant des LT CD4 : les LB de la zone marginale

Les LB T2 choisissant la voie de la zone marginale vont se différencier en LB de la zone marginale (LB MZ). Ils tiennent leur nom de leur localisation importante dans la zone marginale de la rate (**Figure 4**). Il a été observé chez des patients ayant subi une ablation de la rate une diminution de la proportion des LB MZ suggérant que la rate constitue une niche pour ces cellules<sup>23</sup>. Les LB MZ sont également retrouvés dans d'autres SLO, qui possèdent aussi une zone marginale, notamment les ganglions lymphatiques, les amygdales et les plaques de Peyers dans les GALT (gut-associated lymphoid tissues)<sup>23</sup>. Les signaux aboutissant à la différenciation des LB T2 en précurseur MZP puis en LB MZ ne sont pas bien connus mais dépendraient de la force de reconnaissance du BCR pour l'antigène, de l'expression de Notch2 ainsi que de la présence de BAFF<sup>24,25</sup>. La signalisation Notch2 est importante pour le développement des LB MZ puisque des souris déficientes en Notch 2 ou en son ligand DL-1 présentent un défaut de développement des LB MZ<sup>26,27</sup>. Une étude chez l'homme a également montré l'importance de la signalisation Notch2/DL-1 pour la génération de LB MZ<sup>28</sup>. Une fois différencié, les LB MZ peuvent se retrouver dans la circulation sanguine affichant un phénotype : IgM+IgD+CD27+<sup>23</sup>.

La localisation marginale des LB MZ permet un contact privilégié avec les antigènes présents dans la circulation sanguine et de ce fait les LB MZ seraient spécialisés dans la reconnaissance d'antigènes présents dans le sang, notamment ceux provenant de bactéries encapsulées<sup>29</sup>. En accord avec cette spécialisation, il a été observé que des patients splénectomisés et donc ayant une proportion de LB MZ plus faible ont une susceptibilité accrue aux infections à bactéries encapsulées<sup>30</sup>. Des études ont également montré que les LB MZ pouvaient se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps, notamment IgM et IgG, après stimulation *in vitro* en présence ou non de *Staphylococcus aureus*<sup>31,32</sup>.

Les LB MZ développent des réponses antigéniques indépendamment de l'aide aux LT. En effet, les patients splénectomisés ne répondent pas à des vaccins constitués de polysaccharides connus pour induire une immunité LT-CD4 indépendante<sup>30</sup>. Une autre étude a montré une expansion clonale de LB IgM+IgD+CD27+ de la rate et du sang lors d'une vaccination contre *Streptococcus pneumoniae* qui elle aussi induit une réponse LT CD4 indépendante<sup>33</sup>. Des études ont cependant montré que les LB MZ présentent des mutations des chaînes variables de leur BCR bien qu'en moindre nombre que les LB mémoires<sup>31,34,35</sup>. Ainsi il a été observé chez les patients ne possédant pas de centres germinatifs du fait d'une déficience en CD40L, la présence de LB MZ présentant des mutations au niveau de leur BCR indiquant que les LB MZ

peuvent se développer et effectuer des SHM indépendamment de la réaction du centre germinatif et de l'aide des LT CD4<sup>36</sup>. Les LB MZ possèdent un BCR muté mais peu spécifique des antigènes et développent une réponse B qui est T-indépendante.



**Figure 4 : Anatomie de la rate. D'après Pillai et Cariappa, 2009<sup>25</sup>.**

Les LB de la zone marginale doivent leur nom à leur localisation. La zone marginale se trouve en périphérie de la pulpe blanche de la rate. Elle est séparée des follicules par ce qu'on appelle le sinus marginal. Les LB MZ se développent au sein de la zone marginale de la rate ou d'autres SLO.

Toutefois, des études réalisées chez la souris ont pu montrer que les LB MZ pouvaient être impliqués dans des réponses dépendantes des LT CD4<sup>37,38</sup>. Il y a peu de données chez l'homme mais une étude a montré que les LB MZ peuvent induire une réponse contre la toxine du choléra, un antigène protéique de façon dépendant des LT CD4<sup>39</sup>.

### III- Les fonctions des lymphocytes B

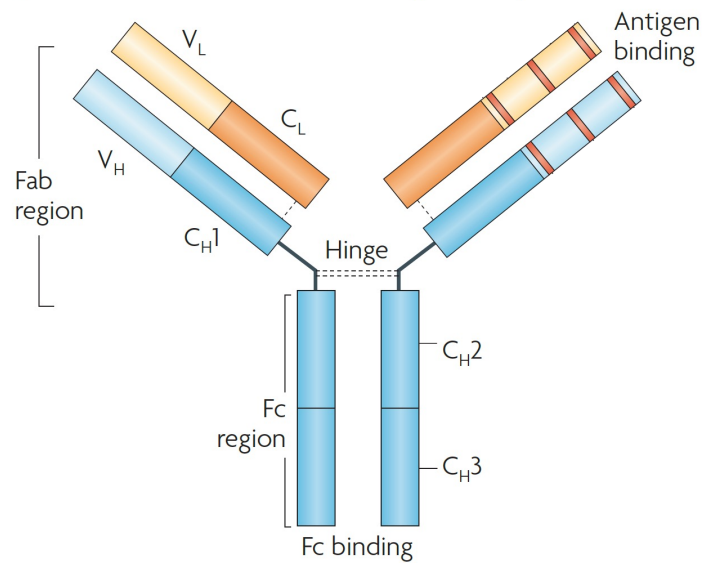
Les LB sont classiquement décrits comme des cellules spécialisées dans la sécrétion d'anticorps lors de la réponse humorale. Cependant les LB peuvent également présenter l'antigène notamment aux LT CD4 et sécréter des cytokines inflammatoires ou régulatrices participant ainsi à la régulation de la réponse immunitaire.

## A) La sécrétion d'anticorps

Les plasmocytes à courte et longue durée de vie sont les cellules spécialisées dans la production d'anticorps. Les plasmocytes à longue durée de vie sont issus de la réaction du centre germinatif. Avant de devenir un plasmocyte mature, les LB passent par un stade de plasmablaste avant d'atteindre le dernier stade de maturation correspond au plasmocytes qui sont CD38<sup>+</sup>CD138<sup>+</sup><sup>40,41</sup>.

Les plasmocytes différenciés vont assurer leur fonction de cellule productrice d'anticorps. Les anticorps ont une structure biochimique en Y. Ils sont composés de deux chaînes légères identiques (LC) et de deux chaînes lourdes identiques (HC). Les LC sont composées d'un domaine constant et d'un domaine variable. Il existe deux types de chaînes légères,  $\kappa$  ou  $\lambda$ . Les HC sont composées d'un domaine variable et de 3 ou 4 domaines constants constituant la région constante (**Figure 5**). Il existe cinq types de région constante que l'on appelle isotype et qui détermine la classe des Ig :  $\mu$ ,  $\delta$ ,  $\gamma$  (1 à 4),  $\epsilon$  et  $\alpha$  (1 à 2). Ces HC vont donner respectivement des IgM, IgD, IgG, IgE et IgA. Chaque anticorps est composé d'un seul type de LC et HC. Les IgM et les IgA présentent une particularité, une chaîne J leur permettant de former respectivement des pentamères et des dimères. Le type d'Ig sécrété dépend des signaux reçus par le LB dans le centre germinatif lors de la commutation de classe ou switch isotypique et est influencé notamment par les cytokines exprimées par les TFh (IL-21, IL-4). Les différents isotypes ou classes d'anticorps ont des propriétés et des fonctions différentes permettant une réponse diversifiée et adaptée contre un large panel de pathogènes<sup>42</sup>. Les fonctions associées aux anticorps incluent la neutralisation, l'activation du complément, l'opsonisation et la cytotoxicité dépendante des anticorps.





**Figure 5 : Structure des anticorps. D'après Hansel et al., 2010<sup>43</sup>.**

Les anticorps, ou immunoglobulines, sont composés de deux chaînes légères ici notés L et de deux chaînes lourdes notés ici H. La LC est composée d'un domaine variable (VL) et d'un domaine constant (CL). Les HC sont reliées entre elles et aux LC par des ponts disulfures. Chaque HC est composé d'un domaine variable (VH) et de trois ou quatre domaines constants (CH). Il y a deux régions distinctes. La région Fab correspond à une LC et au VH et au premier CH de la HC. Cette partie reconnaît l'antigène. Elle est reliée par des ponts disulfure au reste des HC qui constitue la région Fc.

Les IgM sont produites par les plasmocytes à courte durée de vie lors d'une réponse immunitaire des LB avec une faible spécificité pour le pathogène. En effet, les IgM sont dites polyréactifs et sont ainsi impliqués dans la lutte contre des agents infectieux de type bactérien, viral ou parasitaire. Leur structure en pentamère s'avère être efficace pour l'élimination des pathogènes et peuvent se lier aux protéines du complément<sup>44</sup>.

Les IgG sont les Ig les plus abondantes dans le sérum et les plus diversifiées avec quatre différentes sous-classes qui ont des fonctions différentes : IgG1, IgG2, IgG3 et IgG4. Les sous-types d'IgG sont capables de se lier aux récepteurs FC favorisant ainsi l'opsonisation par les cellules phagocytaires. Les IgG1 et les IgG3 se lient à tous les FC $\gamma$ R (FC $\gamma$ R I à III), l'IgG4 se lient à FC $\gamma$ RII et FC $\gamma$ RIII tandis que les IgG2 se lient seulement au FC $\gamma$ RII. Les IgG3 et IgG1 sont les plus efficaces pour lier les protéines du complément. Par ailleurs, les IgG1 et IgG3 sont majoritairement impliquées dans les réponses contre des antigènes protéiques tandis que les IgG2 et IgG4 sont principalement générées contre des antigènes polysaccharidiques<sup>45</sup>.

Les IgA sont les Ig les plus abondantes dans le sérum après les IgG. Les IgA sont par contre plus nombreuses que les IgG au niveau des muqueuses, notamment dans les GALT. Les IgA ne lient pas les protéines du complément mais les neutrophiles possèdent les récepteurs des IgA qui peuvent être activés pour induire la cytotoxicité dépendante des anticorps<sup>46</sup>. Au niveau de l'intestin, les IgA pourront donc être directement en contact avec des bactéries, des virus ou diverses toxines. Il existe deux sous types d'IgA : les IgA1 et les IgA2. Les IgA1 se retrouvent majoritairement dans le sérum (environ 90% des IgA sériques) et sous forme monomérique alors que les IgA2 sont localisées majoritairement dans les sécrétions des muqueuses sous forme dimérique avec 60% d'IgA2 dans le colon. Cependant les IgA1 peuvent également être retrouvées dans des muqueuses (80% des IgA au niveau nasal) et peuvent également être rencontrées sous forme dimériques<sup>46</sup>. Les IgA ont donc un rôle important dans la protection contre les infections en neutralisant directement ou en bloquant la liaison des pathogènes au niveau des muqueuses<sup>45,47</sup>.

Enfin, les IgE sont les Ig retrouvées en plus faible quantité dans le sérum et également celles avec la plus courte demi-vie. Les IgE se lient à leur récepteur présent sur les basophiles et mastocytes induisant leur dégranulation. Les IgE sont impliquées dans les infections aux helminthes ainsi que dans l'hypersensibilité et les réactions allergiques<sup>45,48</sup>.

## B) Cellule présentatrice d'antigène

Les LB sont des cellules présentatrices d'antigènes (CPA) professionnelles. Les LB reconnaissent l'antigène grâce à leur BCR entraînant l'internalisation de l'antigène qui va être par la suite exprimé sur les molécules du CMH de classe I et II. Les LB expriment de plus les signaux de co-stimulation tel que CD80, CD86 et CD40 qui sont nécessaires pour présenter l'antigène aux LT CD4<sup>49</sup>. Ainsi, une étude a montré que des LB pouvaient induire, *in vitro*, la prolifération des LT CD4 via le CMH-II après avoir été préalablement activés par des protéines de *Candida albicans*. De plus, les auteurs ont montré que les LB pouvaient induire une polarisation des LT en Th1 et Th17 médiée par *Candida albicans* via les molécules de co-stimulation CD80 et CD86<sup>50</sup>. Ces données montrent un rôle de présentation d'antigène des LB au LT CD4. Les LB sont aussi capables de présenter des antigènes viraux aux LT CD4<sup>51</sup>. En effet, une étude a montré que les LB étaient les principales CPA induisant l'activation des LT CD4 dans un modèle utilisant des dérivés de particules virales<sup>52</sup>.

## C) Sécrétion de cytokines inflammatoires

Les LB sécrètent une large gamme de cytokines notamment inflammatoires tel que l'IL-6, le TNF $\alpha$  ou encore l'IFN $\gamma$  qui peuvent modifier les propriétés d'autres cellules du système immunitaire incluant les LT CD4<sup>49</sup>. En effet, des auteurs ont montré que dans un modèle murin infecté par *Toxoplasma gondii*, les LB par leur sécrétion de TNF $\alpha$  induisent la production, par les LT CD4, d'IFN $\gamma$ , cytokine effectrice d'une réponse Th1<sup>53</sup>. Une autre étude, dans un modèle murin d'infection bactérienne à *Salmonella enterica*, montre qu'une déficience en IFN $\gamma$  spécifiquement dans les LB impacte grandement la réponse Th1, avec notamment une diminution de la production d'IFN $\gamma$  par ces cellules. De plus, cette même étude montre l'importance de l'IL-6 sécrétée par les LB sur la réponse Th17 puisque des souris déficientes en IL-6, spécifiquement dans les LB, présentent une importante diminution de la production d'IL-17<sup>54</sup>.

Il a été observé chez des enfants infectés par le virus de la Dengue, que les LB isolés des patients produisent spontanément de l'IL-6 et du TNF $\alpha$ <sup>55</sup>. Après culture des LB, le surnageant récolté induit l'activation des LT CD4 *in vitro*. Les cytokines sécrétées par les LB peuvent également impacter les propriétés des cellules de l'immunité innée. Une étude a observé que les LB induisent l'activation de macrophages via la production d'IFN $\gamma$ <sup>56</sup>. Enfin, le GM-CSF produit par des LB est capable d'activer des cellules dendritiques dans un modèle murin d'artériosclérose<sup>57</sup>. Par ailleurs, des LB producteurs d'IL-2 pouvaient induire la différenciation des LT en Th2 lors d'infection parasitaire dans un modèle murin<sup>58</sup>.

## D) Sécrétion de cytokines régulatrices

Les LB ont également la capacité de réguler la réponse immunitaire via la production de cytokines anti-inflammatoires telles que l'IL-10 et le TGF $\beta$ . En effet, il a été montré que les LB activés de donneurs sains sécrétant de l'IL-10 suppriment la différenciation en Th1<sup>59</sup>. Une étude sur des patients greffés rénaux a mis en évidence une plus forte expression d'IL-10 par les LB T1 et T2 après activation *in vitro* chez les patients tolérants la greffe comparé à ceux nécessitant le maintien sous immunosuppresseurs et aux donneurs sains, suggérant un rôle des LB dans la tolérance au greffon<sup>60</sup>. Enfin, il a été montré que les LB exprimant à la fois l'IL-10 et le TGF $\beta$  suppriment la prolifération des LT CD4 activés *in vitro*<sup>61</sup>. De plus, les LB sont

capables d'induire une diminution de la production d'IFN $\gamma$  et de IL-17 par des LT CD4 *in vitro* et de favoriser l'orientation des LT en LT régulateurs via notamment la production d'IL-10<sup>62</sup>.

## E) Formation de centres germinatifs ectopiques

La formation de structures lymphoïdes tertiaires peut avoir lieu dans les organes cibles de maladies inflammatoires chroniques telles que les pathologies auto-immunes et les cancers. Ces structures tertiaires sont également appelées centres germinatifs ectopiques (ELS) puisqu'ils partagent des similitudes avec les centres germinatifs des SLO. Les ELS sont caractérisés par l'accumulation de LT CD4, LB, FDC, plasmocytes et macrophages. La présence de ces cellules est possible grâce aux chimiokines également retrouvées dans les centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires tel que CXCL13, CXCL12, CCL19 et CCL21. Les ELS supportent une réponse de type centre germinatif via la production d'anticorps, la maturation d'affinité du BCR des LB via des SHM, la commutation de classe et l'expansion clonale des LB<sup>63,64</sup>. Des ELS peuvent être détectés au niveau du liquide synovial dans la polyarthrite rhumatoïde, des reins dans le lupus érythémateux systémique, des glandes salivaires dans le syndrome de Gougerot-Sjögren et également au niveau des méninges dans la sclérose en plaques. La présence de ces ELS dans ces pathologies est associée à la gravité de la maladie<sup>65</sup>.

## IV-Implication des lymphocytes B dans les maladies auto-immunes

Dans les maladies auto-immunes, les LB peuvent reconnaître des protéines ou des antigènes du soi conduisant à la production d'auto-anticorps. Les LB sont également impliqués dans ces pathologies indépendamment de la production d'anticorps en participant à l'établissement de l'inflammation. Ces dernières années, un rôle des LB dans des pathologies auto-immunes a été mis en évidence, notamment dans le lupus érythémateux systémique et dans la polyarthrite rhumatoïde.

### A) Le lupus érythémateux systémique

Le lupus érythémateux systémique (SLE) est une maladie auto-immune systémique, qui peut toucher la peau, les poumons et les reins. Les LB sont particulièrement impliqués dans la

pathogénèse du SLE par la production d'auto-anticorps dirigés contre des composants nucléaires tel que de l'ADN double brin et l'ARN. Il y a également des auto-anticorps anti-Smith (sm), dirigés contre des composants du spliceosome<sup>66</sup>. La présence de ces auto-anticorps est utilisée pour diagnostiquer la maladie. Les auto-anticorps sont particulièrement virulents lorsqu'ils forment des complexes immuns au niveau des organes cibles, favorisant une inflammation au sein de ces organes. Des études ont ainsi montré une corrélation entre la gravité de la maladie et le taux de plasmocytes dans le sang de patients SLE<sup>67,68</sup>. Par ailleurs, il a été proposé que les LB, via la production d'IL-6, participeraient à la pathogénèse du SLE. En effet, une étude dans le modèle murin du SLE a montré que les LB producteurs d'IL-6 favorisent l'inflammation. De plus, la production d'IL-6 par les LB initie la génération de centre germinatif dit auto-immun. En effet, des souris déficientes spécifiquement en IL-6 dans les LB ne développent pas de centre germinatif ni d'auto-anticorps<sup>69</sup>. Par ailleurs, il a été observé une plus faible proportion de LB exprimant l'IL-10 chez les patients SLE comparé à des individus sains témoignant d'une potentielle perte de fonction régulatrice des LB chez les patients SLE<sup>70</sup>.

Enfin, les patients SLE peuvent présenter des ELS au niveau des reins associés avec la présence de complexes immuns, suggérant que la production locale d'auto-anticorps participe à l'inflammation rénale<sup>71</sup>.

## B) La polyarthrite rhumatoïde

La polyarthrite rhumatoïde (PAR) est une maladie auto-immune systémique qui touche principalement les articulations mais peut impacter d'autres organes tels que les poumons ou le cœur<sup>72</sup>. Des auto-anticorps ont pu être identifiés dans la PAR notamment dans le sérum mais aussi dans le liquide synovial. Tout comme dans le SLE, ces auto-anticorps peuvent former des complexes immuns entraînant une inflammation chronique dans les articulations<sup>73</sup>. Les patients qui ont ces auto-anticorps ont une maladie plus agressive comparé aux patients séronégatifs<sup>74</sup>. Par ailleurs, il a été proposé que les LB pourraient avoir un rôle indépendant de la production d'anticorps dans la PAR. Dans un modèle murin de la PAR, le modèle PGIA (proteoglycan-induced arthritis), les LB sont des cellules présentatrices indispensables au développement de la pathologie. En effet, les LB dirigés contre le proteoglycan induisent des LT auto-réactifs dans ce modèle. En absence de LB, les LT auto-réactifs ne sont plus induits et les souris ne développent pas de maladie<sup>75</sup>. La production de cytokines inflammatoires par les LB peut aussi favoriser le développement de lésions dans les articulations. En effet, une étude dans un modèle murin de la PAR montre que, via la production de TNF $\alpha$  et de CCL3, les LB bloquent la

différenciation des ostéoblastes, cellules impliquées dans la synthèse de la matrice osseuse<sup>76</sup>. Les auteurs ont confirmé leurs résultats chez des patients PAR. En effet, comparé à ceux de donneurs sains, les LB de patients inhibent la différenciation des ostéoblastes *in vitro* via la production de CCL3 et de TNF $\alpha$ . En accord avec cette observation, les LB de patients PAR stimulés *in vitro*, expriment plus de TNF $\alpha$  comparé à ceux des individus sains<sup>77</sup>. De plus, il a été observé chez des patients PAR une diminution de la fréquence de LB exprimant l'IL-10 comparé à des individus sains. Cette diminution est corrélée à la gravité de la maladie<sup>78</sup>. Enfin, une étude a montré une diminution des LB CD27+IgD+ (LB MZ) chez les patients PAR comparé à des sujets sains<sup>79</sup>. Les auteurs de cette étude proposent que les propriétés fonctionnelles des LB CD27+IgD+ sont impactées chez les patients PAR. Ils observent chez des patients répondants positivement à des traitements anti-TNF $\alpha$ , une restauration de la proportion des LB CD27+IgD+ par rapport aux patients qui n'y répondent pas. Ils suggèrent donc que la déficience de ces cellules pourrait être impliquée dans la progression de la maladie.

Dans la PAR, environ 40% des patients présentent des ELS au niveau du tissu synovial des articulations et leur présence est associée à la sévérité de la maladie<sup>65</sup>.

### C) La sclérose en plaques

Le rôle des LB dans la sclérose en plaques a été mis en évidence suite aux succès des immunothérapies supprimant les LB. Durant ma thèse, nous nous sommes particulièrement intéressés à l'implication de LB dans la pathogenèse de la sclérose en plaques. Nous verrons dans le chapitre suivant la physiopathologie de cette maladie.

# Chapitre 2 : La sclérose en plaques

## I- Historique de la sclérose en plaques

Les premières descriptions de patients atteints de la sclérose en plaques (SEP) datent du début du 19<sup>ème</sup> siècle. Cependant, c'est en 1868 que le terme sclérose en plaques fut utilisé pour la première fois par deux neurologues français, Jean-Martin Charcot et Alfred Vulpian dans « Histologie de la sclérose en plaques »<sup>80</sup> qui décrit cliniquement et anatomiquement la SEP. Pour Charcot, trois symptômes principaux permettent de différencier la SEP des autres maladies neurologiques, la dysarthrie (trouble de l'élocution), le nystagmus (mouvement involontaire des yeux) et les tremblements intentionnels (tremblement des bras lors d'un mouvement volontaire vers une cible) : c'est la triade de Charcot. C'est à partir de l'observation, après autopsie, de petites plaques au niveau du cerveau et de la moelle épinière que Charcot nomma cette pathologie la sclérose en plaques<sup>80</sup>. Les nombreuses observations de patients lui permettent alors d'identifier trois formes de la SEP : la forme spinale, la forme céphalique et la forme cérébrospinale.

Charcot constate une atteinte des fibres nerveuses, avec une démyélinisation et une perte axonale. Ces observations seront confirmées au milieu du 20<sup>ème</sup> siècle<sup>81-82</sup>. Les travaux publiés par Charcot témoignent d'une difficulté à diagnostiquer la SEP, se reposant d'abord sur les symptômes de patients puis sur l'observation, post-mortem, des plaques dans le SNC. A la fin du 19<sup>ème</sup> siècle, les premières ponctions lombaires sont réalisées chez des patients suspectés d'avoir une maladie neuronale à syphilis ou une SEP dans l'espoir de différencier ces deux pathologies. Vers 1960, la découverte de bandes oligoclonales d'immunoglobulines dans le liquide céphalo-rachidien (LCR) encourage un diagnostic de la SEP. L'apparition des techniques d'imagerie à résonance magnétique (IRM) vers les années 1980 permet l'observation de plaques de démyélinisation dans le SNC, facilitant ainsi le diagnostic<sup>81</sup>.

Concernant l'étiologie de la SEP, les premières hypothèses portent sur une infection d'origine virale ou bactérienne, ainsi que sur une origine génétique, en témoigne des cas de SEP dans des familles<sup>83</sup>. Ce n'est qu'au début des années 1940 que l'implication du système immunitaire sera évoquée avec la découverte de  $\gamma$ -globuline dans le LCR de patients<sup>84</sup>. Deux décennies plus tard, la découverte de bandes oligoclonales dans le LCR ainsi que l'implication

du système HLA dans la susceptibilité à la SEP confirmeront l'implication du système immunitaire dans la pathologie de la SEP<sup>81</sup>.

Aujourd'hui, grâce aux progrès de la science et aux avancées technologiques, la SEP est définie comme une maladie auto-immune du système nerveux central (SNC) pour laquelle il existe des options thérapeutiques. Cependant, les causes de cette maladie multifactorielle restent peu connues et il n'existe pas de traitement efficace pour lutter contre les formes les plus invalidantes de la SEP. Il est donc nécessaire de mieux comprendre la pathogénicité de la SEP pour proposer de nouveaux traitements.

## II- La sclérose en plaques

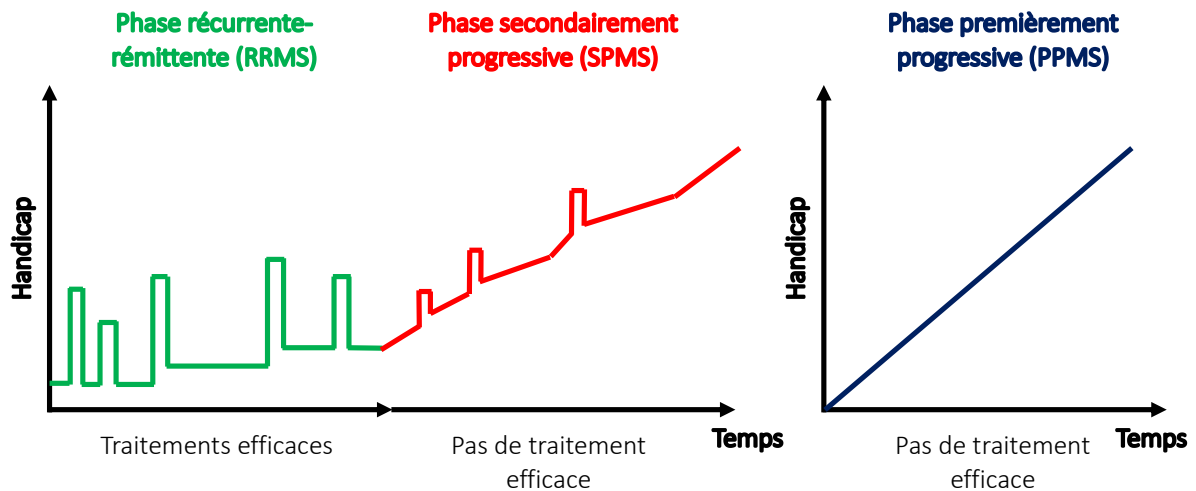
La SEP est une maladie auto-immune, inflammatoire, chronique du système nerveux central qui est le résultat de la destruction de la gaine de myéline et des tissus associés. Cette maladie affecte plus de 2,5 millions de personnes dans le monde et environ 100 000 personnes en France selon Santé publique France. C'est une maladie du jeune adulte, diagnostiquée aux alentours de 30 ans<sup>85</sup>, affectant trois femmes pour un homme<sup>86</sup>. Les symptômes altèrent la qualité de vie des patients, avec notamment des perturbations motrices, sensorielles et cognitives. La SEP se manifeste selon différentes formes cliniques : la forme récurrente-rémittente (RRMS), la forme secondairement progressive (SPMS) et la forme premièrement progressive (PPMS). Au diagnostic, 85% des patients présentent une forme RRMS, caractérisée par des épisodes d'atteintes neuronales suivies de rémissions complètes ou quasi-complètes. Néanmoins, 10 à 25 ans en moyenne après le diagnostic, 80% de ces patients vont évoluer en phase SPMS, caractérisée par des atteintes neuronales continues, sans période de rémission. Enfin, 15% des patients présentent au diagnostic une forme PPMS définie par des atteintes neuronales continues sans période de rémission. Cette forme affecte autant les hommes que les femmes (**Figure 6**).

Le diagnostic de la SEP repose sur l'examen clinique du patient, l'IRM ainsi que l'analyse du LCR. Chez la majorité des patients, la manifestation clinique commence par un premier épisode d'atteinte neuronale appelé le syndrome clinique isolé (CIS). Tous les patients CIS ne développeront pas une SEP. En effet, des études ont montré que dans le cas où une lésion du SNC typique de la SEP est identifiée par IRM, 60 à 80% des patients CIS développeront une SEP. Cependant, si aucune lésion n'est observée à l'IRM, 80% des patients



CIS ne développeront pas de SEP et l'épisode de CIS restera donc l'unique épisode d'atteinte neuronale<sup>87</sup>. Un patient CIS sera en effet diagnostiqué SEP dès lors qu'un deuxième épisode d'atteinte neuronale se produit. La localisation des lésions dans le temps et dans l'espace (localisation des lésions dans le SNC propre à la SEP) associés à l'examen clinique permet de diagnostiquer la SEP en s'appuyant sur les critères de McDonald<sup>88</sup>. Une ponction lombaire peut être également réalisée pour déterminer la présence de bandes d'immunoglobulines de type G (IgG) oligoclonale dans le LCR des patients. Ces bandes sont identifiées par électrophorèse du LCR, elles ne sont pas présentes dans le sérum et reflètent donc une réaction inflammatoire propre au SNC. Ces bandes oligoclonales d'IgG sont présentes chez environ 90% des patients SEP et aident au diagnostic de la SEP<sup>89,90</sup>. Cependant, elles sont également retrouvées dans d'autres pathologies inflammatoires du SNC. En 1983 est publiée une échelle permettant d'évaluer le handicap du patient SEP et l'évolution de la maladie, c'est l'EDSS (Expanded disability status scale)<sup>91</sup>.

Des options thérapeutiques sont disponibles pour prévenir les poussées en phase RRMS. Concernant les formes progressives de la maladie, il n'existe actuellement aucun traitement d'efficacité avérée pour ces patients. Il est possible que certaines des thérapies nouvellement utilisées en phase RRMS permettent d'éviter ou de ralentir le passage en phase SPMS. Cependant, les données disponibles à ce jour ne permettent pas au vu de la progression de la SEP dans le temps et de la nouveauté de ces traitements de déterminer leurs impacts sur la progression de la maladie.



**Figure 6 : Les différentes formes cliniques de la SEP**

Il existe trois différentes formes cliniques de la SEP. Au diagnostic, la majorité (85%) des patients présentent une forme RRMS caractérisée par des atteintes neuronales suivie de rémissions complètes ou quasi complètes. Dix à 25 ans après le diagnostic de RRMS, 80% des patients vont développer une forme SPMS qui est plus agressive et caractérisée par des dommages neurologiques continus sans période de rémission. Dix à 15% des patients présentent au diagnostic, une forme PPMS caractérisée par des dommages neuronaux sans période de rémission dès le début de la maladie. Il n'existe pas de traitements efficaces pour les formes progressives (SPMS et PPMS) de la SEP.

### A) Étiologie de la sclérose en plaques

L'étiologie de la SEP est peu connue et multifactorielle. Différents facteurs notamment génétiques, environnementaux et infectieux ont été identifiés comme impliqués dans la susceptibilité à la SEP.

Les premières hypothèses concernant une implication génétique viennent des observations de plusieurs cas de SEP au sein d'une même famille. En effet, si un membre de sa famille au premier, deuxième ou troisième degré est atteint de la SEP, le risque pour un individu de développer une SEP est environ de 10 à 15%<sup>92</sup>. Dans le cas de jumeaux monozygotes, le risque de développer une SEP est de 30 à 40% pour un individu dont le jumeau est atteint de SEP<sup>93</sup>. A partir de ces observations, de nombreuses études à l'échelle du génome ont vu le jour, les GWAS (genome-wide association studies). Ces études ont permis l'identification de gènes conférant une susceptibilité à la SEP, notamment des gènes associés au système immunitaire comme les gènes du système HLA. En effet, l'allèle associé à une plus forte susceptibilité à la SEP est HLA-DRB1\*15:01 et les personnes possédant cet allèle ont trois fois plus de risques de développer la SEP<sup>94</sup>. En revanche, d'autres allèles peuvent être associés à une protection, tel

que l'allèle HLA-A\*02:01<sup>94,95</sup>. D'autres variants génétiques, en dehors du système HLA, ont pu également être identifiés comme conférant une susceptibilité à la SEP. Il s'agit notamment de variant du gène codant pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-7 (allèle IL7RA) et du gène codant pour la chaîne  $\alpha$  du récepteur à l'IL-2 (allèle IL2RA)<sup>96</sup>. Ces facteurs génétiques ne suffisent pas à expliquer le développement de la SEP, mais mettent en avant l'implication du système immunitaire dans la susceptibilité à la SEP.

La distribution de la SEP n'est pas homogène dans le monde, indiquant l'implication de facteurs environnementaux dans le développement de la SEP. En effet, la répartition de la SEP suit un gradient Nord-Sud. Plus on s'éloigne de l'équateur, plus le risque de développer la SEP augmente<sup>97</sup>. Une raison pouvant expliquer ce gradient est l'exposition au soleil notamment via la vitamine D, produite après une exposition au soleil, puisque les pays avec la plus forte prévalence se trouvent dans des régions du monde moins ensoleillées. Un taux élevé de 25-hydroxyvitamin D3 (vitamine D) dans le sérum est en effet associé à une diminution du risque de SEP<sup>98</sup>. De plus, un taux élevé de vitamine D est associé à une baisse des dommages axonaux chez les patients SEP<sup>99</sup>, ainsi qu'à une baisse du risque de poussée chez les patients en phase RRMS<sup>100</sup>. Une étude a montré que l'alimentation riche en vitamine D était associée à une diminution du risque de SEP chez des personnes peu exposées à la lumière du soleil<sup>101</sup>. D'autres facteurs environnementaux sont aussi impliqués dans le développement de la SEP, tel que le tabagisme, une alimentation déséquilibrée, l'obésité.

Il existe également une association entre susceptibilité à la SEP et infection virale. En effet, l'Epstein-Barr virus (EBV) est proposé comme pouvant être impliqué dans le développement de la SEP<sup>102</sup>. Tout d'abord, il a été observé qu'une infection symptomatique à l'EBV multiplie par 2 le risque de développer la SEP<sup>103</sup>. D'autres observations ont conduit à montrer un plus haut taux sérique d'anticorps dirigé contre des antigènes nucléaires de l'EBV (EBNA-1) chez les patients SEP comparés à des individus sains<sup>104</sup>. Une autre étude a montré que l'ensemble des patients qui allaient développer une SEP et qui avaient une sérologie négative pour l'anticorps anti-EBNA-1 se sont converti en sérologie positive pour ces anticorps avant le début de la maladie<sup>105</sup>. De plus, des anticorps anti-EBNA-1 ont été retrouvés dans le LCR de patients SEP et la présence d'anticorps anti-EBNA-1 dans le sérum est corrélée avec l'apparition de nouvelles lésions dans le SNC, suggérant un effet de l'infection à EBV sur l'activité de la maladie<sup>106,107</sup>. Des LB et des plasmocytes infectés par l'EBV ont également été retrouvés dans le SNC de patients SEP notamment au niveau de lésions corticales chez des

patients SPMS<sup>108,109</sup>. Par ailleurs, la présence de LT spécifiques de l'antigène EBNA-1 a été décrite chez les patients SEP. Ces LT réagissent également contre les protéines de la myéline, faisant naître l'hypothèse d'un mécanisme de mimétisme moléculaire par lequel l'EBV favoriserait la susceptibilité à la SEP<sup>110</sup>. Il est aussi proposé que l'EBV pourrait favoriser la production de cytokines pro-inflammatoires par les LB et ainsi participer à l'inflammation<sup>111,112</sup>.

Enfin, deux récentes études renforcent l'hypothèse qu'une infection à l'EBV est impliquée dans le développement de la SEP. La première étude est réalisée sur une cohorte de plus de 10 millions de personnes dont 955 individus qui vont développer une SEP<sup>113</sup>. Les auteurs ont recueilli des prélèvements avant l'apparition des premiers signes cliniques de la SEP et ont identifié 801 individus qui n'étaient pas infectés par l'EBV à l'époque où les premiers prélèvements avaient été effectués. Parmi les 801 personnes non infectées, 800 ont été infectées par l'EBV avant le développement de la SEP. Le taux de séroconversion chez les personnes ayant développées une SEP était donc de 97% alors qu'il était de 57% chez les patients n'ayant pas développés de SEP. Ainsi les auteurs identifient un risque 32 fois plus important de développer la SEP après une infection à l'EBV. La deuxième étude montre que des anticorps présents dans le LCR de patients SEP lient un épitope de la protéine EBNA1 de l'EBV et qu'ils réagissent par mimétisme antigénique contre une protéine du système nerveux central, GlialCAM, exprimée par les astrocytes et oligodendrocytes. Ces anticorps sont présents chez 20 à 25% des patients SEP étudiés<sup>114</sup>.

L'ensemble de ces données indiquent un lien entre l'infection à l'EBV et le développement de la SEP. Toutefois, d'autres investigations sont nécessaires pour prouver l'implication de l'EBV dans le développement de la SEP notamment du fait que la majorité des individus dans le monde présentent une infection à l'EBV (90%)<sup>115</sup>.

L'ensemble des facteurs génétiques, environnementaux et infectieux connus ne suffisent pas à expliquer totalement l'étiologie de la SEP. D'autres investigations sont donc nécessaires, même si une combinaison de certains facteurs pourrait augmenter la susceptibilité à la SEP comme dans le cas de l'association entre la présence de l'allèle HLA-DRB1\*15:01 et l'infection à l'EBV<sup>116,117</sup>.

## B) Traitements

De nombreuses options thérapeutiques, ayant pour but de traiter l'inflammation et prévenir les poussées, existent pour les formes RRMS de la SEP<sup>118-120</sup>. En revanche, peu ou pas d'options existent pour les phases progressives de la maladie. Les traitements ciblent en majorité le système immunitaire, en le modulant, ce sont les immunomodulateurs ou bien en le supprimant, on parle alors d'immunosuppresseurs.

### **Les traitements de première ligne en phase RRMS :**

La majorité des traitements utilisés en première ligne sont des immunomodulateurs, tels que :

- L'interféron bêta (1a,1b) qui est un anti-inflammatoire.
- Les corticoïdes tel que le Méthylprednisolone sont utilisés pour traiter les poussées.
- L'acétate de glatiramère, qui est un anti-inflammatoire composé de peptides de synthèses. Avec l'interféron bêta ce sont les traitements de fond les plus utilisés.
- Le diméthyle fumarate qui cible NRF2 (nuclear factor erythroid-derived 2-like2) qui est impliqué dans les réponses aux réactifs de l'oxygène. Ce traitement permet une réponse anti-inflammatoire.
- Le tériflunomide qui cible la synthèse des pyrimidines ce qui empêche la prolifération des lymphocytes activés.

### **Les traitements de seconde ligne en phase RRMS :**

Lorsque les traitements de première ligne ne s'avèrent pas assez efficaces, des traitements de seconde ligne sont administrés aux patients. Ces traitements ciblent directement le système immunitaire, soit pour éliminer les cellules immunitaires pathogéniques, soit pour leur empêcher l'accès au SNC :

- Le Rituximab et l'Ocrelizumab sont des anticorps dirigés contre la molécule CD20 qui provoque l'élimination des LB.
- Le Natalizumab, un anticorps monoclonal humanisé dirigé contre la sous-unité  $\alpha 4$  de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  inhibe la migration des lymphocytes dans le SNC<sup>121</sup>.
- L'Alemtuzumab est un anticorps monoclonal, ciblant le CD52 qui induit l'élimination à la fois des LT et des LB.

- Le Fingolimod est un analogue de la sphingosine-1-phosphate qui agit en modulant son récepteur. Il permet de bloquer la sortie des lymphocytes des SLO et limite donc leur accès au SNC.
- Le Mitoxantrone est un intercalant de l'ADN ciblant les cellules immunitaires.

### **Les traitements pour les phases progressives de la maladie**

- Certains traitements utilisés en RRMS comme les interférons et le Mitoxantrone peuvent aussi être utilisés pour les formes progressives.
- Le cyclophosphamide est un agent alkylant et interagit donc avec l'ADN. Il cible principalement les LB et LT.
- Le méthotrexate cible l'acide folique ce qui bloque la synthèse de l'ADN et ralentie la prolifération immunitaire.
- L'Ocrelizumab peut être bénéfique pour certains patients en phase PPMS.

## c) Physiopathologie de la sclérose en plaques

Les études sur les prélèvements humains, incluant les études à l'échelle du génome, ainsi que les études dans le modèle murin de la SEP, ont permis de mettre en évidence l'implication du système immunitaire dans cette pathologie. Les études chez l'homme sont réalisées à partir de prélèvements sanguins, de prélèvements de LCR et sur des échantillons de cerveaux post-mortem. Les études murines font appel principalement au modèle de l'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE).

### 1- Modèle EAE : encéphalomyélite auto-immune expérimentale

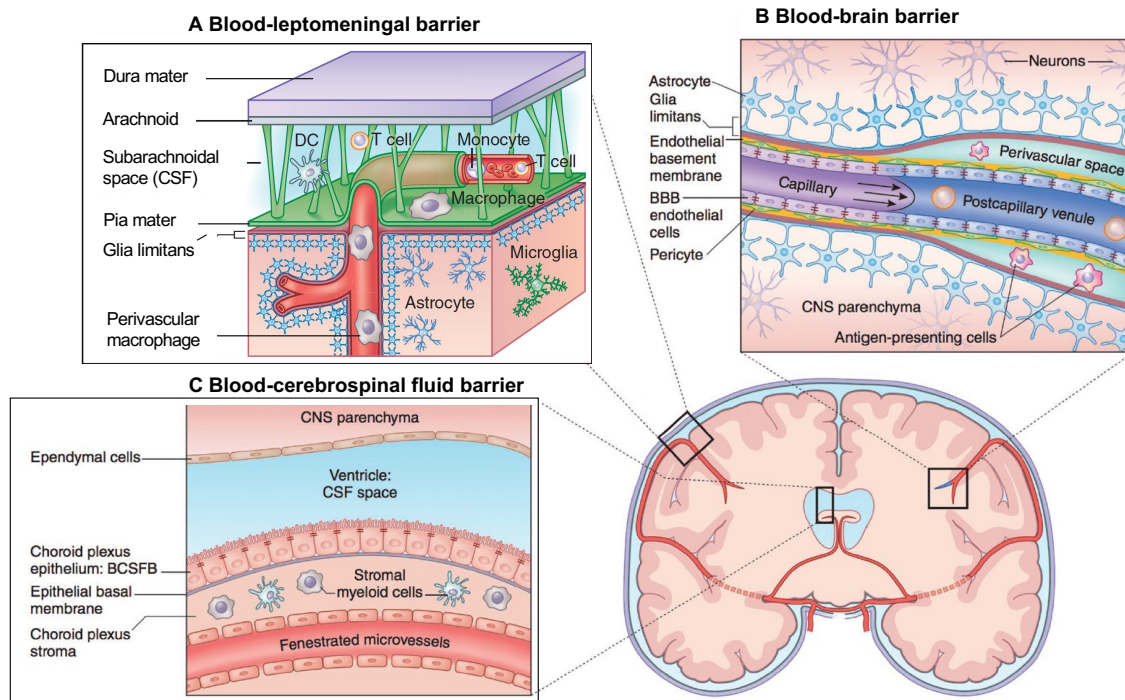
Les études sur l'EAE ont permis d'étudier l'implication du système immunitaire dans la SEP mais également l'efficacité de certaines options thérapeutiques. Le modèle EAE est né aux alentours des années 1930 lorsque un groupe de chercheur a tenté de reproduire les complications encéphaliques observées après des vaccinations contre la rage. Au fur et à mesure de leurs observations, ils se sont rendus compte que les animaux partageaient des similitudes avec la SEP observée chez l'homme<sup>122</sup>. Le modèle EAE reproduit certaines caractéristiques pathologiques présentes chez l'homme notamment des lésions du SNC avec une perte axonale et une démyélinisation. Pour initier le développement de l'EAE chez les

souris, une des méthodes est l'injection de peptides de la myéline, notamment MOG (myelin oligodendrocyte glycoprotein), MBP (myelin binding protein) ou PLP (protéine protéolipide)<sup>123</sup>. L'injection de ces peptides est couplée à l'injection d'un adjuvant comme par exemple l'adjuvant complet de Freund et de la toxine pertussique pour perméabiliser la barrière hémato-encéphalique (EAE active). Une autre méthode d'induction de l'EAE est le transfert adoptif dans des souris naïves de LT CD4 spécifique de la myéline induit par immunisation (EAE passive). De plus, il existe des modèles d'EAE spontanée, reposant sur des souris modifiées génétiquement pour exprimer des TCR ou des BCR spécifiques de la myéline<sup>124</sup>. Le modèle d'EAE transgénique le plus utilisé est celui des souris SJL/J dont les LT CD4 expriment un TCR dirigé spécifiquement contre le peptide MOG92-106 ce qui induit le développement d'une EAE spontanée chez ces souris<sup>125</sup>.

Cependant, l'utilisation du modèle EAE peut entraîner des biais dans l'étude de la SEP. En effet, l'utilisation d'adjuvant force la réaction immunitaire et l'utilisation de la toxine pertussique perturbe l'intégrité de la barrière hémato-encéphalique. De plus, les modèles d'EAE active et passive mais aussi reposant sur des TCR transgéniques induisent un biais en faveur d'une réponse dépendante des LT CD4. Enfin, le modèle EAE ne reproduit que partiellement les aspects pathologiques observés chez l'homme et ne reflète donc pas l'entière complexité de la pathogénicité de la SEP.

## 2- Migration des cellules du SI dans le SNC

Le SNC est composé du cerveau et de la moelle épinière et du LCR qui est produit localement au niveau du plexus choroïde. Il est aujourd'hui établi que le SNC et le système immunitaire communiquent dans les deux sens. Cependant, l'accès au SNC des cellules immunitaires est hautement régulé. Il existe trois barrières physiologiques majeures permettant le trafic moléculaire et cellulaire entre le SNC et la circulation sanguine : la barrière hémato-méningée (BHM), la barrière hémato-encéphalique (BHE), et la barrière sang-LCR (**Figure 7**)<sup>126</sup>.



**Figure 7 : Migration des cellules immunitaires dans le SNC d'après Furtado et. al, 2018<sup>127</sup> et Prinz et Priller, 2017<sup>128</sup>.**

Il existe trois différentes barrières pour accéder au SNC. En A) la barrière hémato-méningée qui correspond à la séparation entre les vaisseaux sanguins et le LCR au niveau de l'espace sous arachnoïdien. En B) la barrière hémato-encéphalique composée de cellules endothéliales, de péricytes et d'astrocytes. La migration à travers la BHM et la BHE fait intervenir différentes molécules d'adhésions comme par exemple les axes ICAM-1/LFA-1 et VCAM-1/VLA-4 ainsi que ALCAM, notamment exprimées par les LB. En C), la barrière sang-LCR située au niveau du plexus choroïde, fait intervenir les molécules CCL20 et CCR6 pour le processus de migration des cellules du système immunitaire.

La BHE est la barrière du SNC la plus étudiée, elle sépare la circulation sanguine du parenchyme cérébral. Elle est composée principalement de cellules endothéliales, liées par des jonctions serrées formant une monocouche cellulaire ainsi que par des péricytes et des astrocytes<sup>129</sup>. La BHM, quant à elle, correspond à l'interface entre les vaisseaux sanguins situés dans les méninges et l'espace sous-arachnoïdien. Elle est composée d'une couche unicellulaire d'endothélium vasculaire liée aussi par des jonctions serrées<sup>130</sup>. Le processus de migration à travers la BHE et la BHM fait intervenir des molécules d'adhésions, de migration, d'activation exprimées à la fois par les cellules endothéliales des vaisseaux sanguins mais également par les cellules immunitaires souhaitant accéder au SNC<sup>126</sup>.



Les molécules exprimées par les cellules endothéliales sont<sup>131</sup> :

- ICAM-1 (intracellular adhesion molecule 1) et ICAM-2, qui vont interagir avec leur ligand LFA-1 (lymphocyte function associated molecule 1) également connu sous le nom d'intégrine  $\alpha L\beta 2$ .

- VCAM-1 (vascular cell adhesion molecule 1) qui interagit avec son ligand VLA-4 (very late antigen 4), appelée aussi intégrine  $\alpha 4\beta 1$ , exprimée par les cellules immunitaires.

- La P-sélectine qui va interagir avec son ligand PSGL-1 (P-selectin glycoprotein ligand 1).

- ALCAM (activated leukocyte cell adhesion molecule) est exprimée par les cellules endothéliales et peut se lier à son ligand CD6 ou à une autre molécule ALCAM exprimée par les cellules immunitaires. L'expression de ALCAM par les LB semble favoriser leur migration à travers la BHM<sup>132</sup>.

Des chimiokines tel que CCL2, CCL4, CCL5 et CXCL12 peuvent aussi être sécrétées par les cellules endothéliales, ces chimiokines vont interagir avec leur récepteurs respectifs CCR1, CCR2, CCR5 et CXCR4/7 exprimés par les cellules immunitaires<sup>126</sup>.

La barrière sang-LCR est située au niveau du plexus choroïde qui est le lieu de production du LCR. Cette barrière est composée de cellules épithéliales du plexus choroïde qui séparent le LCR du stroma vascularisé où circulent les cellules du SI. Les cellules épithéliales sont liées par des jonctions serrées et le passage des cellules immunitaires à travers cette barrière fait appel à des molécules d'adhésions comme la P-sélectine et à la sécrétion de chimiokines comme CCL20, sécrétée par les cellules épithéliales du plexus choroïde, et son récepteur CCR6, exprimé notamment par les LT<sup>133,134,135</sup>.

La présence de cellules immunitaires chez des individus sains dans le LCR suggère la perméabilité de la BHE et/ou de la BHM et/ou du plexus choroïde<sup>134</sup>.

### 3- Phase inflammatoire aigüe

La phase RRMS est caractérisée par des lésions démyélinisées actives au niveau du SNC avec la présence d'infiltrat de cellules de l'immunité innée et adaptative<sup>136</sup>. Les lésions démyélinisées du SNC sont localisées majoritairement dans la substance blanche en phase

RRMS. L'utilisation du gadolinium pour la réalisation des IRM permet de mettre en évidence la perméabilité de la BHE<sup>137</sup>. Cette perturbation de l'intégrité de la BHE favorise le passage de cellules du système immunitaire activées notamment des macrophages, des LT et des LB<sup>138</sup> (**Figure 8**).

### a) Les cellules de l'immunité innée

Les cellules de l'immunité innée, notamment des macrophages, des microglies et des cellules dendritiques sont présentes dans les lésions du SNC de patients SEP<sup>139,140</sup>.

Les microglies sont des cellules gliales apparentées à des macrophages du SNC qui ont comme principale fonction de surveiller le SNC pour détecter la présence de pathogènes. Une étude chez des patients SEP a montré que les microglies activées sont une source de stress oxydatif notamment via la production d'espèce réactive de l'oxygène, ce qui pourrait participer aux développements des lésions du SNC<sup>141</sup>. Dans le modèle EAE, il a été observé au niveau des sites des dommages axonaux, une accumulation de microglie. Les auteurs ont alors bloqué l'accumulation de ces cellules réduisant ainsi les dommages axonaux<sup>142</sup>. De plus, les microglies sont capables de sécréter des cytokines pro-inflammatoires tel que l'IL-6, l'IL-18, l'IL-1 $\beta$  et le TNF $\alpha$ . Elles sécrètent également les chimiokines CCL2 et CCL5. La sécrétion de ces molécules a un rôle important dans le développement de l'EAE, notamment en favorisant l'inflammation et le recrutement de cellules immunitaires au niveau du SNC<sup>143</sup>. Cependant, les microglies sont aussi capables de produire des cytokines anti-inflammatoires tel que l'IL-10 et sont également impliquées dans la réparation tissulaire en favorisant la remyélinisation. En effet, une étude a montré que les microglies peuvent induire la différenciation des oligodendrocytes, cellules impliquées dans la formation de la myéline<sup>144</sup>. De plus, les microglies phagocytent les débris de myéline ce qui est indispensable pour le phénomène de remyélinisation<sup>145</sup>. Les microglies ont donc différents rôles dans la pathogenèse de la SEP, en favorisant l'inflammation mais sont également impliquées dans les phases de remyélinisation.

A l'image des microglies, les macrophages peuvent également produire des réactifs de l'oxygène et participer ainsi aux lésions du SNC<sup>141</sup>. Les monocytes infiltrent le SNC dès l'initiation de l'EAE, pour se différencier ensuite en macrophages et induire la démyélinisation<sup>146</sup>. Les macrophages sont capables de sécréter des facteurs pro-inflammatoires tel que le TNF $\alpha$ . Ces facteurs inflammatoires sont impliqués dans la sévérité de l'EAE, notamment en orientant la réponse des LT CD4 en faveur d'une réponse inflammatoire mais

également en perturbant l'intégrité de la BHE<sup>147</sup>. Cependant, tout comme les microglies, les macrophages participent également à la remyélinisation et à la réparation neuronale, notamment via la phagocytose des débris de myéline<sup>148</sup>.

## b) Les LT CD4

Les données obtenues à partir du modèle EAE et des prélèvements de patients en phase RRMS ont permis d'identifier les LT CD4 en particulier les Th1, Th17 et les Th1/Th17 comme des acteurs clés dans la pathogenèse de la SEP. En effet, le transfert adoptif de Th1 ou Th17 dans des souris naïves induit le développement de l'EAE contrairement au transfert de Th2<sup>149</sup>. Il a été observé chez des souris déficientes pour la sous unité p40 de l'IL-12, une résistance à l'induction à l'EAE. Suite à cette observation, il a été conclu que les Th1 étaient impliqués dans le développement de l'EAE puisque la différenciation d'un LT naïf en Th1 nécessite l'IL-12.<sup>150</sup> Cependant, la découverte de l'IL-23 a remis en question le rôle des Th1 dans l'EAE. En effet, l'IL-12 et l'IL-23 partagent la sous unité p40. L'IL-23 est une cytokine impliquée dans la différenciation des LT naïfs en Th17. Il a alors été observé chez des souris déficientes en p19, l'autre sous unité de l'IL-23, une résistance à l'induction à l'EAE ce qui n'est pas le cas chez les souris déficientes en p35 l'autre sous unité de l'IL-12<sup>151</sup>. Ces données montrent que l'IL-23, et non l'IL-12, est nécessaire à l'induction de l'EAE suggérant une implication des Th17 plutôt que des Th1 dans l'EAE. D'autres signaux que l'IL-23 sont nécessaires à la différenciation en Th17 notamment le signal médié par l'IL-1. Des souris déficientes en récepteur à l'IL-1 affichent une résistance à l'induction à l'EAE<sup>152</sup>. Des études se sont alors intéressées aux cytokines produites par les Th1 et les Th17 pour déterminer le mécanisme d'action de ces cellules dans la pathogenèse de la SEP. Il a ainsi été montré que les souris déficientes en IFN $\gamma$  sont sensibles à l'induction de l'EAE<sup>153</sup>. Les cytokines sécrétées par les Th17, tel que l'IL-17, IL-21 et l'IL-22 ne semblent pas non plus jouer un rôle clé dans l'induction à l'EAE puisque les souris déficientes en ces cytokines sont toujours sensibles à l'induction de l'EAE<sup>154-156</sup>.

Des LT CD4 présentant des caractéristiques de Th1 et Th17, notamment co-exprimant l'IL-17 et l'IFN $\gamma$  ainsi que Tbet et ROR $\gamma$ t, les facteurs de transcription des Th1 et Th17 respectivement, ont été retrouvés dans le SNC des souris EAE<sup>157</sup> et de patients. Ces LT CD4 sont appelés Th1/Th17 et il a été proposé que les Th17 se différenciaient en Th1/Th17 sous l'influence de l'IL-1 $\beta$  et de l'IL-12<sup>158</sup>. Le GM-CSF sécrété par les Th1 et les Th1/Th17 est

impliqué dans la pathogenèse de l'EAE puisque le blocage spécifique de la sécrétion de GM-CSF par les LT CD4 réduit la sévérité de l'EAE<sup>159,160</sup>.

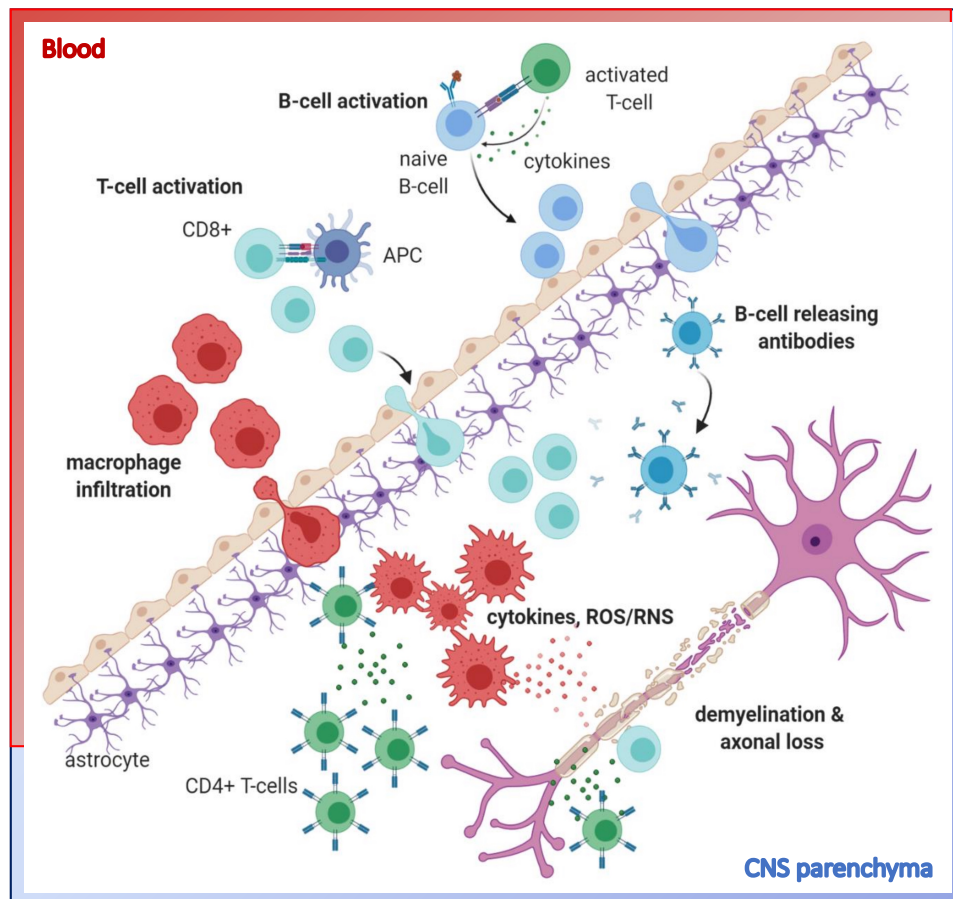
Chez l'homme, un groupe de chercheur a pu observer une augmentation de la fréquence de Th1 et Th17 dans le LCR de patients en phase RRMS comparé à leur fréquence dans la circulation sanguine<sup>161</sup>. De manière intéressante, les auteurs ont également observé une plus forte proportion de Th17 dans le LCR de patients en rechute comparé aux patients en rémissions. Par ailleurs, une signature Th1 et Th17, avec une augmentation de l'expression des gènes codant pour l'IFN $\gamma$  et l'IL-17A, pu être observée dans des lésions du SNC de patients<sup>162</sup>. Concernant les Th1/Th17, une étude a montré la présence de LT CD4 produisant de l'IL-17 et de l'IFN $\gamma$  au niveau de lésions du SNC chez des patients en phase RRMS<sup>163</sup>. Les auteurs ont pu également observer que les LT sécrétant à la fois de l'IL-17 et de l'IFN $\gamma$  migraient de manière plus importante à travers la BHE dans un modèle de migration *in vitro*. Enfin, une plus forte proportion de Th1/Th17, produisant de l'IFN $\gamma$  et du GM-CSF, a été identifié dans le LCR que dans le sang de patients RRMS<sup>164</sup>.

La SEP étant une maladie auto-immune, des études se sont intéressées aux LT CD4 réagissant contre les protéines de la myéline. Il a ainsi été observé, chez des patients SEP, une réactivité des LT CD4 contre des protéines de la myéline notamment MOG et MBP. Ces LT dit auto-réactifs ont également été observés chez des individus sains<sup>165</sup>. Cependant, les LT auto-réactifs de patients SEP possèdent un profil plus inflammatoire que les LT CD4 auto-réactifs de donneurs sains, avec une expression plus importante de CCR6 et une plus forte sécrétion d'IL-17, d'IFN $\gamma$  et de GM-CSF suggérant ainsi une implication des Th1/Th17 dans la SEP<sup>166,167</sup>.

### c) Les LT CD8

Les LT CD8 sont plus nombreux à infiltrer le SNC que les LT CD4 en phase RRMS. Ces lymphocytes cytotoxiques sont retrouvés en grand nombre au niveau de lésions démyélinisées chez des patients en phase RRMS et leur nombre corrèle avec la sévérité de la maladie<sup>168</sup>. Il a été observé une expansion clonale de LT CD8 au niveau des lésions du SNC, du LCR et également dans le sang<sup>169</sup>. La présentation antigénique aux LT CD8 se fait via le CMH-I qui contrairement aux CMH-II est exprimé par la plupart des cellules gliales et des neurones qui peuvent donc présenter des antigènes neuronaux aux LT CD8<sup>170</sup>. Les LT CD8 de

par leur fonction cytotoxique via la production de perforine et granzyme peuvent participer directement au développement des lésions du SNC. En outre des LT CD8 sécrétant d'IL-17 ont été retrouvés au niveau de lésions actives du SNC suggérant que les LT CD8 peuvent également participer à l'inflammation du SNC<sup>171</sup>.



**Figure 8 : Immunopathologie de la SEP dans le SNC en phase inflammatoire aiguë d'après Afzal et al. 2020<sup>172</sup>.**

Les cellules immunitaires peuvent accéder au SNC notamment via la BHE et vont s'accumuler dans le parenchyme cérébral. Les cellules ayant migrées et les cellules résidentes, tel que les microglies, vont initier la dégradation neuronale et la démyélinisation, via la sécrétion de facteurs pathogéniques solubles ou directement par contact cellulaire.

#### d) Les lymphocytes B

Différents sous types de LB sont présents dans le LCR de patients en phase RRMS, avec notamment une augmentation de la proportion de LB mémoires et LB CD27+IgD+ dans le LCR comparé à leur proportion dans la circulation sanguine<sup>173</sup>. De plus, il a été observé une

augmentation de l'expression de ALCAM par les LB chez les patients en phase RRMS comparé à des individus sains<sup>132</sup>. Ces LB ALCAM+ sont également retrouvés au niveau de lésions dans le SNC de patients SEP. La migration des LB dans le LCR suggère leur implication dans la pathogénicité de la SEP.

## i. Les anticorps

Historiquement, une implication des LB dans la SEP a été proposée suite à la découverte de bandes oligoclonales d'IgG dans le LCR de patients SEP, en 1959<sup>174</sup>. Il a également été montré, dans une plus faible proportion (environ 40% de patients SEP), la présence dans le LCR de patients SEP de bandes oligoclonales d'IgM qui est associée à une maladie plus active et inflammatoire<sup>175,176,177</sup>.

Plusieurs études se sont intéressées aux anticorps présents dans le LCR de patients afin de déterminer la présence et la spécificité d'éventuels auto-anticorps dans la SEP. Une étude a montré que des anticorps du LCR de patients SEP réagissent contre des auto-protéines ubiquitaires intracellulaires<sup>178</sup>. Les auteurs suggèrent que les bandes oligoclonales pourraient être générées à cause de débris de cellules mortes induits lors de lésions du SNC plutôt que d'être à l'origine de ces lésions. Leur réelle implication dans la SEP n'est pour l'instant pas connue.

D'autres groupes ont cherché à déterminer si les anticorps du LCR de patients SEP étaient spécifiques d'antigènes du SNC et plusieurs candidats ont été proposés, notamment des protéines de myéline comme la MOG. Des anticorps anti-MOG ont été retrouvés au niveau de lésions de démyélinisations<sup>179</sup>. Des études ont également montré que des anticorps extraits du LCR de patients avec la SEP pouvaient induire, via le système du complément, la démyélinisation du SNC *in vitro*<sup>180,181</sup>. Cependant, l'implication d'auto-anticorps anti-MOG reste un sujet controversé. En effet, des pathologies inflammatoires avec démyélinisation du SNC présentent aussi des anticorps anti-MOG et ce en une plus grande proportion que chez les patients atteints de la SEP, le terme de trouble du spectre MOG a été proposé pour faire référence à ces pathologies inflammatoires<sup>182</sup>. D'autres auto-antigènes ont été proposés tel que MBP suite à la découverte d'anticorps anti-MBP dans le sérum des patients SEP. Cependant, des anticorps anti-MBP ont également été retrouvés dans le sérum de donneurs sains<sup>183</sup>. Il a été proposé que la présence d'anti-MOG et anti-MBP chez les personnes CIS était un pronostic en faveur du

développement de la SEP. Néanmoins, Khule et. al, n'ont pas trouvé d'association entre la présence de ces anticorps dans le sérum de patients CIS et le développement de la SEP<sup>184</sup>. Enfin, des auto-anticorps dirigés contre KIR4.1, un canal potassique exprimé notamment par des astrocytes et oligodendrocytes, ont été retrouvés chez la moitié de patients SEP dans une étude<sup>185</sup> tandis qu'une autre étude montre un pourcentage de patients avec des anti-KIR4.1 plus faibles<sup>186</sup>. Ces études témoignent de la complexité d'étudier la présence d'auto-anticorps et de la diversité des patients atteints de SEP.

La présence d'auto-anticorps, leur spécificité et leur fonction pathologique est donc un sujet controversé, dépendant des méthodes de détections des anticorps. Cette difficulté de détection d'auto-anticorps fait opposition à d'autres maladies du SNC tel que la neuromyéélite optique (NMO) où des anticorps anti-aquaporine-4 sont présents et servent au diagnostic de cette pathologie<sup>187</sup>. Plus généralement, c'est également le cas dans de nombreuses de maladies auto-immunes, avec l'identification claire d'auto-anticorps, notamment dans le lupus érythémateux systémique et la polyarthrite rhumatoïde permettant le diagnostic de ces maladies<sup>188,73</sup>. L'implication pathogénique des LB dans la SEP via la production d'auto-anticorps reste encore à être clarifiée. La présence chez certain patient d'auto-anticorps ainsi que la présence de bandes oligoclonales chez 90% des patients témoigne cependant d'une activation des LB dans le SNC. Bien que la pathogénicité des bandes oligoclonales ne soit pas établie, leur présence est un outil diagnostique de la SEP.

Le rôle des LB dans la pathogenèse de la SEP a été réévalué au milieu des années 2000, suite au succès en phase RRMS du traitement par le Rituximab, un anticorps monoclonal chimérique dirigé contre la molécule CD20 exprimé par les LB<sup>189,190</sup>. Le Rituximab induit la déplétion des LB exprimant CD20 par différents mécanismes, tels que la cytotoxicité médiée par le complément et la cytotoxicité cellulaire dépendante des anticorps<sup>191</sup>. La déplétion des LB par le Rituximab induit une amélioration symptomatique des patients en phase RRMS en réduisant notamment les rechutes. Cependant, le nombre de plasmocytes et le niveau sérique d'anticorps ne sont pas altérés par le Rituximab puisque la molécule CD20 n'est pas exprimée par les plasmocytes ce qui indique que les LB sont impliqués dans la SEP indépendamment de leur production d'anticorps. L'Ocrelizumab a lui aussi été utilisé pour traiter les patients en phase RRMS. L'Ocrelizumab est un anticorps humanisé qui cible un épitope de CD20 différent du Rituximab permettant de favoriser la cytotoxicité dépendante des anticorps<sup>192</sup>. Tout comme

le Rituximab, l'Ocrelizumab induit efficacement la déplétion des LB, avec une diminution de l'activité de la maladie et des rechutes, tout en conservant les plasmocytes et les anticorps<sup>193</sup>.

Le succès de ces thérapies anti-CD20 a permis de mettre en évidence le rôle pathogénique des LB, indépendant de la production d'anticorps, en phase RRMS. Plusieurs fonctions des LB dans la SEP, en phase RRMS ont alors été proposées : rôle de cellule présentatrice d'antigène, rôle d'activation des LT indépendants de la reconnaissance antigénique via la sécrétion de cytokines, et rôle régulateur également via la sécrétion de cytokines (**Figure 9**).

## ii. Cellules présentatrices d'antigènes

Les LB sont des CPA professionnelles pouvant présenter un antigène au LT via les molécules du complexe majeur d'histocompatibilité de classe II (CMH-II). Les LB sont capables de reconnaître des épitopes dit conformationnels et sont efficaces pour présenter un antigène même présent en faible quantité<sup>194,195</sup>. La fonctionnalité et l'implication des LB en tant que CPA ont été mises en évidence dans différentes pathologies et notamment lors d'infections<sup>196,197,198</sup>. Les résultats observés dans le modèle murin de la SEP indiquent une implication des LB dans la SEP en tant que CPA. En effet, des souris avec des LB déficients en CMH-II deviennent résistantes à l'induction de la maladie dans le modèle EAE induit par l'injection de la protéine MOG<sup>199,200</sup>.

Le CMH-II sert de signal 1 pour l'activation des LT, le signal 2 se fait via les molécules de co-stimulations notamment CD80, CD86 et CD40. Des études montrent une plus forte expression de CD80, CD86, CD40 et des molécules de CMH-II par les LB des patients en phase RRMS, comparé aux LB de donneurs sains<sup>201-203</sup>. De plus, il a été montré que des LB mémoires provenant de patients en phase RRMS sont capables d'induire, en présence de MOG ou MBP, une meilleure prolifération des LT CD4 ainsi qu'une plus forte sécrétion d'IFN $\gamma$  par les LT CD4 que des LB provenant de donneurs sains, *in vitro*<sup>204</sup>. L'ensemble de ces travaux supporte un rôle des pathogéniques des LB en phase RRMS médié par leur capacité à présenter l'antigène aux LT CD4 et à les activer.



### iii. Sécrétion de cytokines

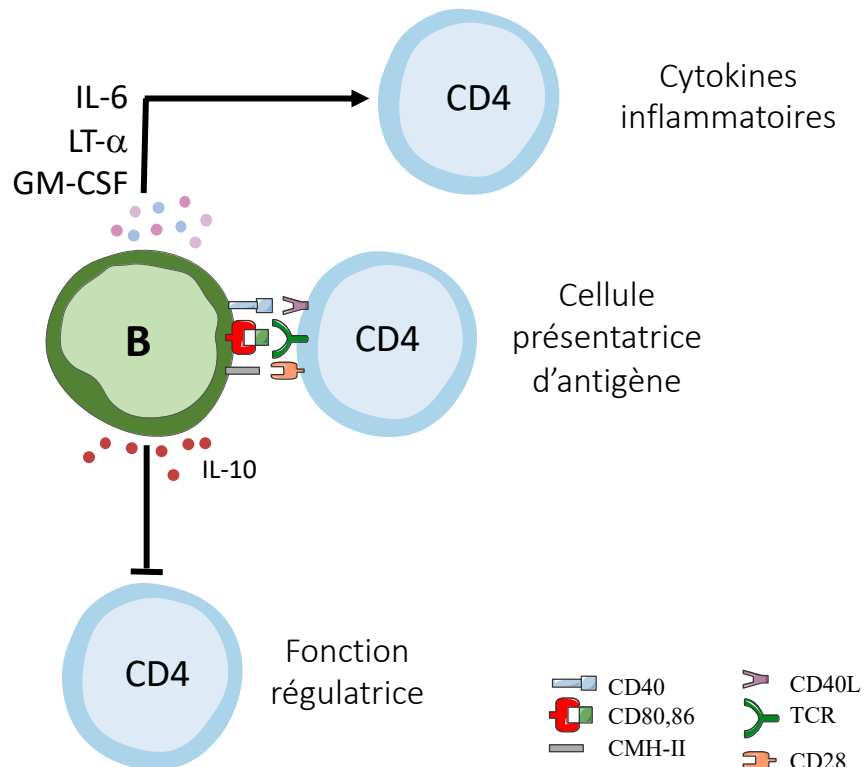
Les LB sont capables d'orienter une réponse immunitaire via la sécrétion de cytokines pro ou anti-inflammatoires indépendamment de contact cellulaire, on parle d'« effet bystander »<sup>205</sup>. Dans la SEP, le profil cytokinique des LB est impacté comparé aux individus sains en faveur d'un profil cytokinique inflammatoire qui peut notamment modifier les propriétés des LT CD4. En effet, des études ont montré que les LB de patients SEP sécrètent plus de TNF $\alpha$ , LT $\alpha$  et d'IL-6 que ceux de donneurs sains. Une plus forte proportion de LB exprimant du GM-CSF a également été observée chez les patients SEP après activation *in vitro*<sup>206-208</sup>. Barr et al., ont montré que lorsque des souris étaient déficientes en IL-6 spécifiquement dans les LB, le développement de l'EAE était atténué avec une diminution de la réponse Th17 identifiée par une plus faible sécrétion d'IL-17. De plus, ces auteurs ont montré chez les patients en phase RRMS, que les LB avaient un plus haut niveau de sécrétion d'IL-6 que les donneurs sains mais qu'après traitement au Rituximab, la production d'IL-6 par les LB de patients était identique à celle des individus sains. Ils ont également observé une plus faible production d'IL-17 par les PBMC de patients RRMS après déplétion des LB<sup>207</sup>. Ces données suggèrent que la sécrétion plus importante d'IL-6 par les LB en phase RRMS induit une augmentation de la réponse Th17. Par ailleurs, une autre étude a montré que le Rituximab diminue à la fois la prolifération des LT CD4 mais aussi des LT CD8 avec une plus faible proportion de LT CD4 exprimant l'IFN $\gamma$  et l'IL-17 et une plus faible proportion de LT CD8 exprimant l'IFN $\gamma$ <sup>206</sup>. La prolifération et la sécrétion de cytokines des LT CD4 et CD8 sont restaurées en présence de surnageant de culture de LB de patients RRMS non traités. De plus, le blocage, de la LT $\alpha$  et du TNF $\alpha$  présent dans ces surnageant des LB, diminue la prolifération des LT CD4 et LT CD8, suggérant que les LB sont impliqués dans l'inflammation et la réponse LT via la sécrétion de LT $\alpha$  et de TNF $\alpha$ . Il a également été montré une augmentation de la fréquence de LB exprimant le GM-CSF chez des patients non traités en phase RRMS<sup>208</sup>. Le surnageant de ces LB permet l'induction d'une réponse pro-inflammatoire des macrophages dépendante du GM-CSF puisque le blocage du GM-CSF dans le surnageant empêche l'induction de cette réponse. De façon consistante, une déplétion des LB par traitement au Rituximab entraîne une plus faible réponse inflammatoire par les macrophages de patients RRMS.

L'ensemble de ces données de la littérature supporte une implication des LB dans la SEP de manière indépendante de la production d'anticorps et de contact cellulaire direct via la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires par « effet bystander ».

Les LB sont aussi capables de réguler la réponse immunitaire via la production de cytokines régulatrices telles que l'IL-10 et le TGF- $\beta$ . Il a été observé, chez l'homme, une diminution de sécrétion d'IL-10 par les LB de patients SEP comparativement à ceux de donneurs sains après stimulation *in vitro*<sup>209</sup>. Chez la souris, dans un modèle de déficience de l'IL-10 uniquement chez les LB, il a été observé un développement de l'EAE plus sévère<sup>210</sup>. En revanche, le transfert adoptif de LB produisant de l'IL-10 diminue la sévérité de l'EAE<sup>211</sup>. De même, des souris déficientes en TGF- $\beta$  spécifiquement parmi les LB montrent une induction de l'EAE plus rapide. Il a également été observé une plus forte inflammation du SNC dans les premières phases de l'EAE en absence de TGF- $\beta$  produit par les LB, cette inflammation étant associée à une réponse Th1 et Th17. Ces données indiquent que le TGF- $\beta$  et l'IL-10 produits par les LB ralentissent le développement de l'EAE<sup>212</sup>. Chez la souris, l'IL-35 est aussi une cytokine régulatrice et il a été observé une implication de l'IL-35 dans les phases de récupération de l'EAE et que la production de cette cytokine par les LB limite les réponses inflammatoires. L'IL-35 peut également agir directement sur les LB en induisant des LB producteurs d'IL-10<sup>213,214</sup>.

Il est intéressant de noter que suite au succès des thérapies anti-CD20, un autre traitement a été proposé pour les patients SEP en phase RRMS pour cibler cette fois-ci l'ensemble des populations de LB, y compris les plasmocytes : l'Atacicept<sup>215</sup>. L'Atacicept est une protéine de fusion entre une portion du récepteur TACI (transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin-ligand interactor) et le fragment Fc des IgG. Ce traitement bloque la maturation et la différenciation des LB en se liant aux cytokines BAFF et APRIL. Chez les patients RRMS traités par Atacicept, il a été observé de manière surprenante une augmentation de la fréquence des poussées. Cela met en lumière un potentiel rôle régulateur des LB dans la SEP et notamment des plasmocytes. Dans ce contexte, une étude a montré que des plasmocytes sécrétant d'IL-10 sont présents au niveau de lésions du SNC chez des patients SEP, suggérant que les plasmocytes pourraient être impliqués dans la régulation de l'inflammation dans la SEP<sup>216</sup>. Deux récentes études montrent la présence de plasmocytes sécrétant d'IgA dans le SNC de patients SEP en phase active et dans le SNC de souris

EAE<sup>217,218</sup>. L'étude chez la souris montre que ces plasmocytes producteurs d'IgA sécrètent de l'IL-10 et participent à la régulation de l'inflammation du SNC, suggérant donc un potentiel rôle protecteur des plasmocytes dans la SEP.



**Figure 9 : Les rôles proposés des LB dans la SEP**

Différents rôles des LB dans la pathogenèse de la SEP ont été proposés. Les LB pourraient présenter des auto-antigènes de myéline pour activer les LT CD4. Ils pourraient aussi être impliqués dans la réponse inflammatoire médié par les LT CD4 en les activant par la sécrétion de molécules inflammatoires telle que l'IL-6, on parle « d'effet bystander ». Enfin, une diminution de la sécrétion de cytokines anti-inflammatoires, notamment l'IL-10, par les LB pourrait diminuer leur fonction régulatrice.

#### 4- Phase inflammatoire chronique

Dans les phases progressives de la SEP, la BHE n'est plus perméable. Les patients en phase progressive présentent des lésions de la substance grise avec des atteintes corticales associées à la gravité de la maladie<sup>219</sup>. Il a également été observé de la substance grise d'apparence normale chez les patients en phase progressive, caractérisée par un faible infiltrat immunitaire mais avec une inflammation diffuse et une dégénérescence des axones<sup>220</sup>. Les patients présentent, en outre, moins d'inflammation et de lésions de la substance blanche. Cependant, dans les formes progressives de la SEP, il a été observé la présence au niveau de la

substance blanche de lésions inactives ainsi que de plaques chroniquement actives, avec un infiltrat immunitaire en bordure des lésions et des dommages axonaux en continue<sup>136</sup>. Il existe également de la substance blanche d'apparence normale<sup>219</sup>. La remyélinisation des lésions est possibles chez les patients en phases progressives de la SEP, mais ce phénomène est observé plus largement en phase RRMS<sup>221</sup>.

### a) Les centres germinatifs ectopiques dans la SEP

Par ailleurs, des structures lymphoïdes ectopiques ou ELS ont été retrouvées dans le SNC chez 40% des patients en phase SPMS et leur présence corrèle avec la gravité de la maladie<sup>220,222</sup>. Ces structures sont localisées au niveau des méninges et notamment dans les sillons cérébraux<sup>220</sup>. Pour rappel, ces centres ectopiques germinatifs ou ELS sont composés de LB, plasmocytes, LT CD4 ainsi que des cellules dendritiques folliculaires. La présence de ces structures est associée à une atrophie et démyélinisation corticale marquée par la présence de larges lésions sous-piales adjacentes aux ELS. Une étude a pu observer un gradient de perte de neurones, d'astrocytes et d'oligodendrocytes dans la substance grise à partir de ces structures méningées, suggérant la diffusion de facteurs solubles des ELS vers le cortex<sup>223</sup>. Ces facteurs solubles entraîneraient la formation de lésions corticales, soit directement, soit indirectement en activant les microglies. De plus, il a été montré en post mortem chez des patients SPMS, une plus forte expression d'IL-6, LT- $\alpha$ , CXCL13 et CXCL10 et dans le LCR et les méninges de patients ayant un haut niveau d'inflammation méningée et de démyélinisation de la substance grise<sup>224</sup>. Ces molécules sont connues pour leur rôle dans les processus d'activation des LB et de formation de structures lymphoïdes. Leur présence, à des taux plus élevés dans le LCR et les méninges de patients présentant une atteinte corticale plus sévère, est donc en faveur d'un rôle pathogénique des ELS dans la pathogenèse de la SEP.

En revanche, les centres germinatifs ectopiques sont peu ou pas présents en phase RRMS et PPMS. Toutefois, une étude montre la présence de ELS et des lésions de la substance grise chez des patients présentant une forme fulminante de SEP (SEP aiguë de Marburg)<sup>225</sup>. De plus, il a été observé une inflammation des méninges chez des patients RRMS associée à la présence de lésions corticales<sup>226</sup>. Magliozzi et al, observent que les patients RRMS, au diagnostic présentant une charge lésionnelle de la substance grise importante, ont une plus forte concentration de cytokines soutenant une activité des LB dans le LCR, telles que CXCL13, APRIL, BAFF, l'IL-6 et l'IL-10, comparé aux patients RRMS ayant une faible charge

lésionnelle de la substance grise<sup>224</sup>. De plus, dans une autre étude les auteurs montrent une association entre un taux élevé de CXCL13 dans le LCR des patients RRMS et l'évolution de la maladie, notamment l'apparition lésions corticales<sup>227</sup>.

Concernant la phase PPMS, il n'a pas été observé d'ELS dans les méninges des patients lors d'une étude post mortem. En revanche 30% des patients PPMS de cette étude présentaient une inflammation des méninges caractérisée par la présence d'agrégats de LT et de LB non-prolifératifs<sup>228</sup>. Cette inflammation était associée à une plus forte démyélinisation et perte neuronale corticale ainsi qu'au développement d'une pathologie plus sévère et des décès à un âge plus jeune.

La présence de structures tertiaires, partageant des propriétés des centres germinatifs des organes lymphoïdes secondaires, suggère l'implication des LB mais également des TFh en phase SPMS.

## b) Les lymphocytes B

La présence d'IgM oligoclonales dans le LCR est associée à une évolution plus rapide des patients en phase RRMS vers la phase SPMS<sup>176</sup>. Ces bandes oligoclonales d'IgM sont aussi présentes chez les patients en phase PPMS et leur présence est associée à une inflammation active<sup>229</sup>. Dans les phases progressives de la SEP (SPMS et PPMS), la présence de LB dans le SNC est associée aux lésions démyélinisées, et des plasmocytes sont retrouvés en plus forte quantité dans les lésions actives de la substance blanche et dans les méninges que dans la phase RRMS<sup>168</sup>.

Le profil cytokinique des LB semble être altéré dans les phases progressives de la maladie. Cependant, cette altération a été moins étudiée et décrite qu'en phase RRMS. Une étude s'intéressant au profil cytokinique des LB selon les phases de la maladie<sup>230</sup> montre une plus forte expression d'IL-6 par les LB de patients SEP, toutes phases confondues après stimulation des PBMC *in vitro* par un peptide MOG. En revanche, les LB de patients en phase PPMS ont une plus forte expression de TNF $\alpha$  et IFN $\gamma$ , comparés aux patients RRMS, SPMS et aux donneurs sains. Enfin, durant toutes les phases de la maladie, les LB de patients expriment moins d'IL-10 par rapport aux individus sains.

D'autres travaux ont montré un taux plus élevé de CXCL13 dans le LCR de patients en phase PPMS comparés à des donneurs ayant des céphalées de tension sans signe apparent d'inflammation<sup>231</sup>. De même, parmi les patients en phase progressive (SPMS et PPMS), le taux de CXCL13 dans le LCR est plus élevé chez les patients actifs (rechute dans les 3 mois ou lésions apparues à l'IRM), que chez les patients sans activité récente de la maladie<sup>232</sup>. Ces données sont donc en faveur de l'implication des LB en phase progressive de la SEP, puisque les LB répondent par chimiotactisme au CXCL13.

Concernant les patients en phases PPMS, un essai clinique a montré un léger bénéfice pour les patients traités par l'Ocrelizumab<sup>233</sup>. En effet, à 24 semaines de traitement, 29,6% des patients avaient une progression de la maladie parmi les patients traités, contre 35,7% dans le groupe placebo. Les lésions observées à l'IRM sont diminuées de 3,4% chez les patients traités et augmentées de 7,4% chez les patients du groupe contrôle. Ainsi, l'Ocrelizumab est associé à un taux de progression plus faible comparé aux contrôles, confirmant une potentielle implication des LB en phase SPMS. Le mécanisme par lequel l'Ocrelizumab est bénéfique en phase PPMS n'est pas connu mais des auteurs ont notamment proposé que cela permettrait l'élimination des LB inflammatoires. En effet, les LB pourraient participer à l'inflammation dans le SNC via la sécrétion de molécules neurotoxiques<sup>234</sup>. Les auteurs s'appuient sur des travaux de Lisak et al, qui montrent que le surnageant de LB de patient SEP présente des molécules à haut poids moléculaires qui induisent la mort d'oligodendrocytes *in vitro*<sup>235,236</sup>.

## 5- Les LT folliculaires auxiliaires dans la SEP

Les LT CD4 mémoires exprimant CXCR5 représentent la forme circulante des TFh des centres germinatifs. Les TFh circulants peuvent être catégorisés en différentes populations partageant des similarités avec les LT CD4 conventionnels Th1, Th2 et Th17. Ces TFh peuvent être identifiés dans le sang en fonction de l'expression différentielle de CCR6 et CXCR3. Les TFh2 (CCR6-CXCR3-) et TFh17 (CCR6+CXCR3-) ont été montrés comme aidant la différenciation des LB naïfs, contrairement au TFh1 (CCR6-CXCR3+)<sup>237</sup>. Au vu du rôle pathogénique des LB dans la phase RRMS mais aussi en phase SPMS du fait de la présence d'ELS, il est proposé que les TFh, de par leur fonction spécialisée d'aide aux LB jouent un rôle important dans la pathogenèse de la SEP. L'implication des TFh a été mise en évidence dans d'autres maladies auto-immunes notamment dans le lupus érythémateux systémique et la

polyarthrite rhumatoïde<sup>238</sup>. En revanche, peu d'études se sont intéressées au rôle des TFh dans la SEP. Les TFh pourraient cependant être impliqués dès les premières phases de la maladie. En effet, la concentration de CXCL13, le ligand de CXCR5, est plus importante dans le LCR de patients en phases RRMS que dans le LCR de patients souffrant de maladies neuronales non inflammatoires ou de contrôles<sup>227</sup>. Une concentration de CXCL13 plus élevée dans le LCR en phase RRMS est plus associée à une activité de la maladie plus importante. Par ailleurs, il a été montré que dans le LCR de patients atteints de maladies neuronales la concentration de CXCL13 est corrélée à la fréquence de LT CD4 CXCR5<sup>239</sup>. De plus, il a été retrouvé au niveau de lésions actives de patients SEP la présence de LT exprimant l'IL-21, cytokine sécrétée par les TFh<sup>240</sup>. Une étude par RNAseq sur cellule unique a permis d'identifier des gènes signatures des TFh plus représentés dans le LCR de patients SEP comparé au LCR d'individus contrôles, ce qui n'était pas le cas dans la circulation sanguine<sup>241</sup>. Ces résultats ont été confirmés par cytométrie en flux montrant une plus forte proportion de TFh au sein des LT CD4 dans le LCR de patients SEP comparé au groupe contrôle. De plus, la proportion de TFh ayant un phénotype activé (PD-1+ ou ICOS+) est augmentée dans le LCR de patients SEP et l'augmentation de TFh PD1+ est corrélée avec la proportion de plasmocytes présents dans le LCR de patients SEP. Ces données montrent donc une migration des TFh dans le SNC de patients SEP et sont en faveur d'un rôle pathogénique de ces cellules.

Des modifications du phénotype des TFh ont aussi été mises en évidence dans la circulation sanguine. Une étude a, en effet, montré une augmentation de la fréquence de TFh ICOS+ chez les patients en phase RRMS et SPMS comparé à des sujets sains<sup>242</sup>. De plus, en phase SPMS, la présence de TFh ICOS+ corrèle à la gravité de la maladie. Ces mêmes auteurs ont observé une diminution de la proportion de TFh1 dans toutes les phases de la maladie ainsi qu'une augmentation de TFh17 en phase PPMS suggérant une augmentation de la capacité d'aide aux LB des TFh circulant. Parmi les LT CD4 spécifique de la myéline, Cao et al. ont mis en évidence une surexpression de gènes exprimés par les TFh, notamment CXCR5, IL-21 et ICOS<sup>166</sup>.

L'ensemble de ces travaux montre une expansion des TFh chez les patients SEP notamment dans le LCR avec un profil activé, suggérant une aide active des TFh aux LB dans la SEP.

Pour conclure, la SEP est une pathologie complexe, multifactorielle, impliquant de nombreux composants du système immunitaire notamment les LB. L'origine de la SEP reste à être déterminée. Des chercheurs se sont récemment intéressés à l'implication de facteurs

environnementaux dont le microbiote intestinal dans le développement de la SEP. En effet, des études ont mis en évidence que les patients en phase RRMS ont un microbiote intestinal différents par rapport à des individus sains. De plus, une étude récente a identifié des plasmocytes d'origine intestinale exprimant des IgA dans le LCR de patients en phase RRMS<sup>218</sup>. Au cours de ma thèse, nous nous sommes donc intéressés à l'implication des LB d'origine intestinale dans la pathogenèse de la SEP.

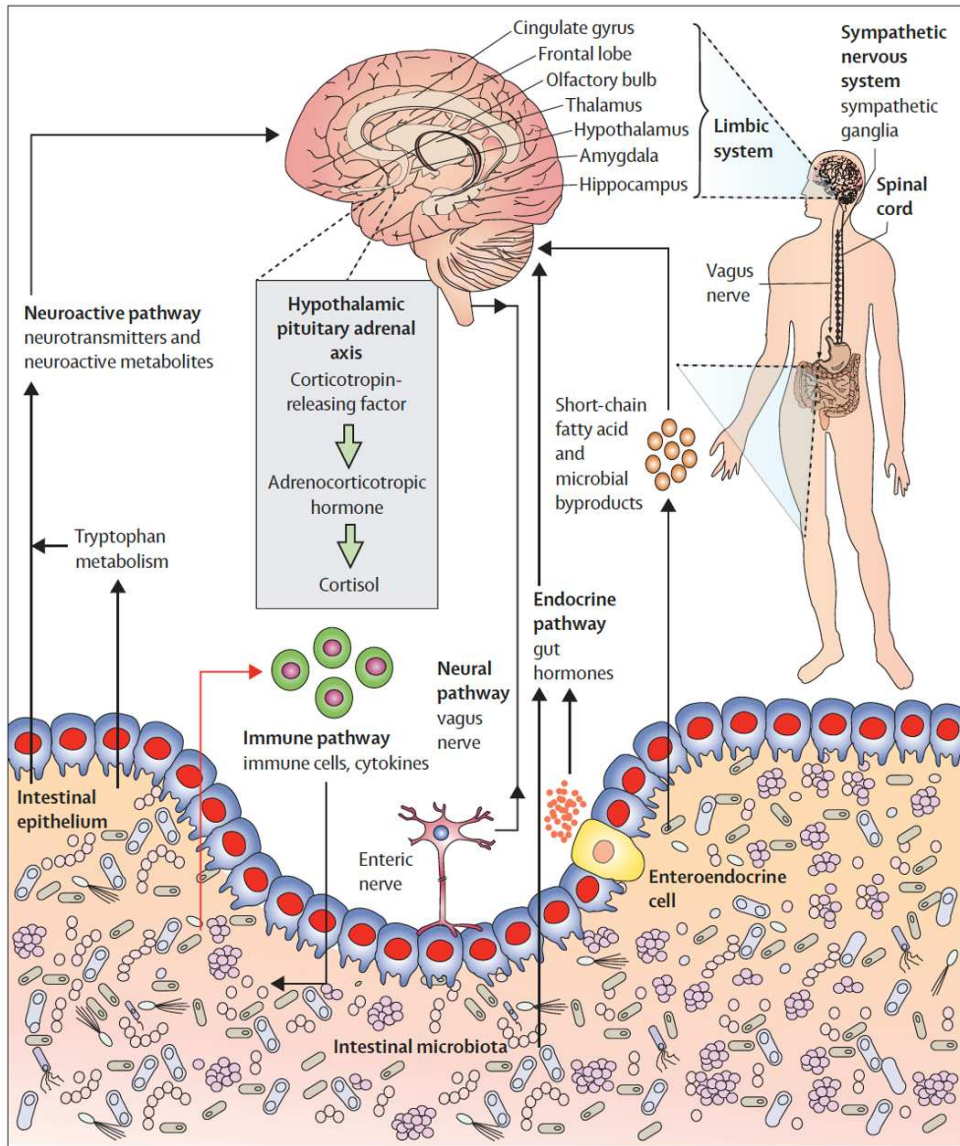


# Chapitre 3 : Le microbiote intestinal dans la SEP

Le tractus gastro-intestinal représente la plus grande surface d'interaction entre l'homme et l'environnement. Il est colonisé par des bactéries, des archées, des virus et des champignons qui constituent le microbiote intestinal. Plus de  $10^{14}$  microorganismes colonisent ainsi le tractus gastro-intestinal<sup>243</sup>. Le microbiote se développe dès la naissance et sa composition est influencée par la nourriture, l'environnement, la prise de médicaments, et la génétique. Il se stabilise vers l'âge de 3 ans pour ressembler à la composition du microbiote de l'adulte. La composition du microbiote est stable et propre à chaque individu mais avec une base microbienne commune. Des signatures microbiennes propre à des régions ont été identifiées, indiquant que le microbiote est sensible à l'environnement<sup>244</sup>.

En situation physiologique, le microbiote intestinal est bénéfique pour l'homme, il le protège contre des attaques de pathogènes et lui fournit des nutriments et vitamines établissant une relation symbiotique avec son hôte. Cet échange est contrôlé, et une véritable communication existe entre le microbiote intestinal et l'organisme notamment avec le SNC. Les communications vers le SNC sont médiées par la voie nerveuse, la voie métabolique/hormonale et la voie immunitaire (**Figure 10**). Le microbiote intestinal produit en effet des molécules telles que la vitamine B12 ou des acides gras à chaîne courte, des acides aminés ou des neurotransmetteurs qui peuvent agir directement sur la barrière intestinale et notamment sur les cellules immunitaires avoisinantes mais aussi sur le système nerveux via les afférences nerveuses présentes dans l'intestin. Ces molécules peuvent également rejoindre la circulation sanguine et avoir un effet direct sur divers organes, notamment sur le cerveau<sup>245,246</sup>.

Dans ce chapitre nous allons particulièrement nous intéresser à l'axe microbiote-système immunitaire, et son implication dans des maladies auto-immunes.



**Figure 10 : Les voies de communications entre le microbiote intestinal et le cerveau.**  
D'après Cryan et al, 2020<sup>247</sup>.

Différentes voies de communications entre le microbiote intestinal et le cerveau existent :

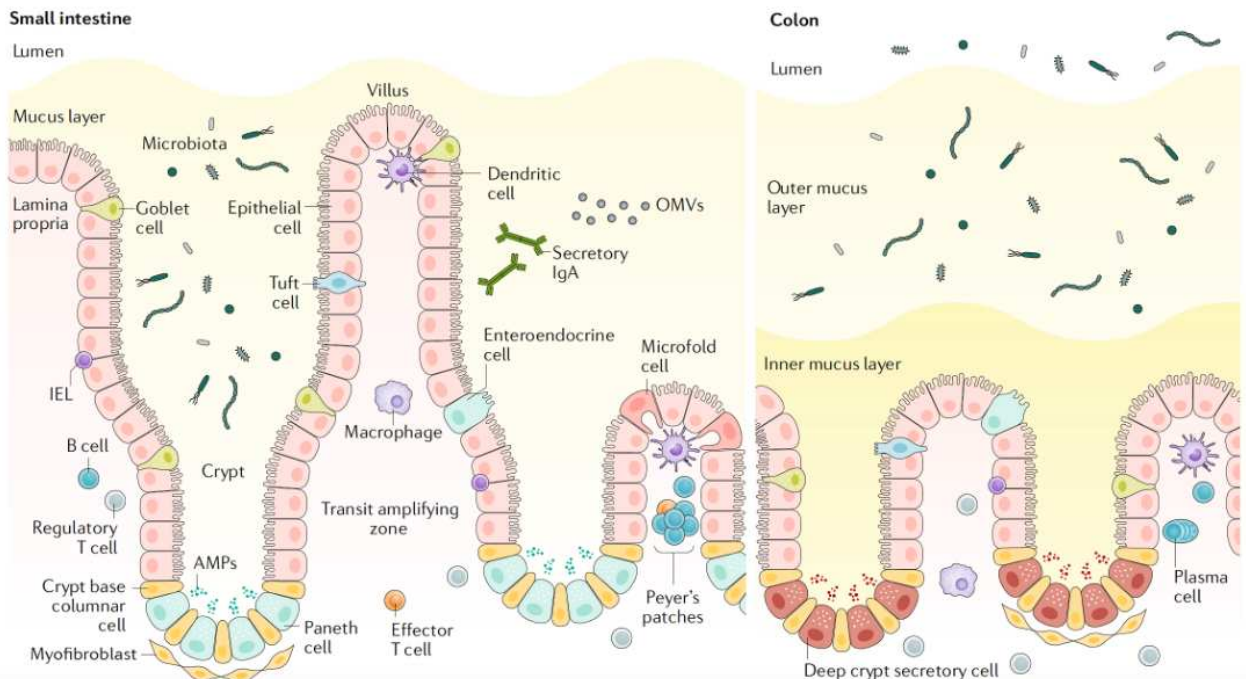
- 1) La voie nerveuse médiée par les nerfs entériques et la sécrétion de neurotransmetteur par le microbiote agissant sur le SNC.
- 2) La voie métabolique/humorale via la sécrétion de différents métabolites par les microbes
- 3) La voie immunitaire lorsque le microbiote intestinal influence les propriétés des cellules immunitaires intestinales.

## I- Relation entre le microbiote intestinal et les cellules du système immunitaire

### A) Généralités sur l'organisation des GALT

La communication entre l'organisme et le microbiote intestinal est fondamentale pour maintenir l'homéostasie. L'enjeu est de préserver l'intégrité du microbiote intestinal tout en évitant l'invasion de pathogènes. Il existe différentes lignes de défense pour prévenir une infection. La première ligne de défense est assurée par une couche de mucus. Les cellules épithéliales intestinales sont en effet recouvertes du côté apical d'une couche de mucus qui contient des peptides antimicrobiens permettant d'empêcher le passage de microbes à travers la barrière de cellules épithéliales intestinales. Il existe plusieurs types de cellules épithéliales avec des fonctions différentes. Par exemple, un type de cellules épithéliales, les cellules de Paneth, après liaison d'un motif microbien, vont sécréter, dans le mucus intestinal, des molécules antimicrobiennes telles que l' $\alpha$ -defensin ou le lysosyme C<sup>248</sup>. Les cellules épithéliales intestinales sont reliées entre elles par des jonctions serrées formant une barrière physique entre les microbes et l'intérieur de l'intestin et constituent la deuxième ligne de défense. Les propriétés des cellules intestinales épithéliales permettent de moduler la perméabilité de la barrière intestinale. En effet, ces cellules expriment des récepteurs leur permettant de distinguer les microbes, ce sont les PRR pour « pattern recognition receptor ». Elles participent donc étroitement à l'immuno-surveillance en empêchant le passage de potentiels pathogènes à travers la barrière intestinale<sup>249</sup> (**Figure 11**).

Enfin, en dessous de la barrière de cellules épithéliales se situe la lamina propria avec la présence de cellules immunitaires constituant la dernière ligne de défense. Dans la lamina propria, des tissus lymphoïdes sont présents, notamment les plaques de Peyer (PP) qui appartiennent aux GALT. Les GALT comprennent également les ganglions mésentériques (MLN) et les follicules lymphoïdes isolés (ILF)<sup>250</sup>. L'accès aux prélèvements intestinaux étant limité chez l'homme, la plupart des études sur les GALT sont réalisées dans les modèles murins. Les études chez des souris dépourvues de germes ou « germ free » (GF) ont montré que la présence du microbiote intestinal était impliquée dans le développement des GALT. En effet, des souris GF possèdent des PP de taille réduite. La formation d'ILF nécessite également la présence et la reconnaissance de bactéries, puisque des souris dépourvu de PRR ne développent pas d'ILF<sup>251</sup>.



**Figure 11 : Structure du système immunitaire intestinal. D'après Burgueño et Abreu, 2020<sup>248</sup>.**

Plusieurs barrières existent pour éviter l'invasion de pathogènes au niveau de l'intestin. Les cellules épithéliales intestinales, qui constituent une barrière physique, sont séparées des microbes par une couche de mucus dans l'intestin grêle et par une bicouche de mucus dans le côlon. Il y a différents types de cellules épithéliales. Dans l'intestin grêle, les entérocytes sont liées entre elles par des jonctions serrées, tandis que dans le côlon ce sont les colonocytes. Les cellules de Paneth sécrètent des peptides antimicrobiens dans la lumière intestinale. Les cellules de type M (microfold) peuvent capturer l'antigène au niveau des PP pour qu'il soit accessible aux cellules dendritiques initiant ainsi une réponse immunitaire. Enfin, les cellules épithéliales permettent aussi le passage dans la lumière intestinale des IgA dimériques, produites par les LB localisés dans la lamina propria.

## B) Communication entre le microbiote intestinal et les cellules immunitaires des GALT

Un déséquilibre dans la composition du microbiote, ou dysbiose, est observé dans de nombreuses pathologies, notamment auto-immunes. Au cours des dernières années, de nombreuses études ont montré que la composition du microbiote intestinal peut impacter les propriétés des cellules du système immunitaire intestinal et modifier la susceptibilité à certaines pathologies, ainsi que la réponse aux immunothérapies dans les cancers (**Figure 12**). Des études ont montré que les souris GF et des souris traitées avec des antibiotiques ont un nombre diminué de Th17 intestinaux<sup>252,253</sup>. La reconstitution du microbiote chez une souris GF restaure le nombre de Th17 dans les GALT indiquant que la présence du microbiote favorise le développement des Th17 intestinaux<sup>254</sup>. La colonisation de souris GF par une bactérie, la *Segmented filamentous bacteria* (SFB) induit une augmentation de l'expression des ARNm de

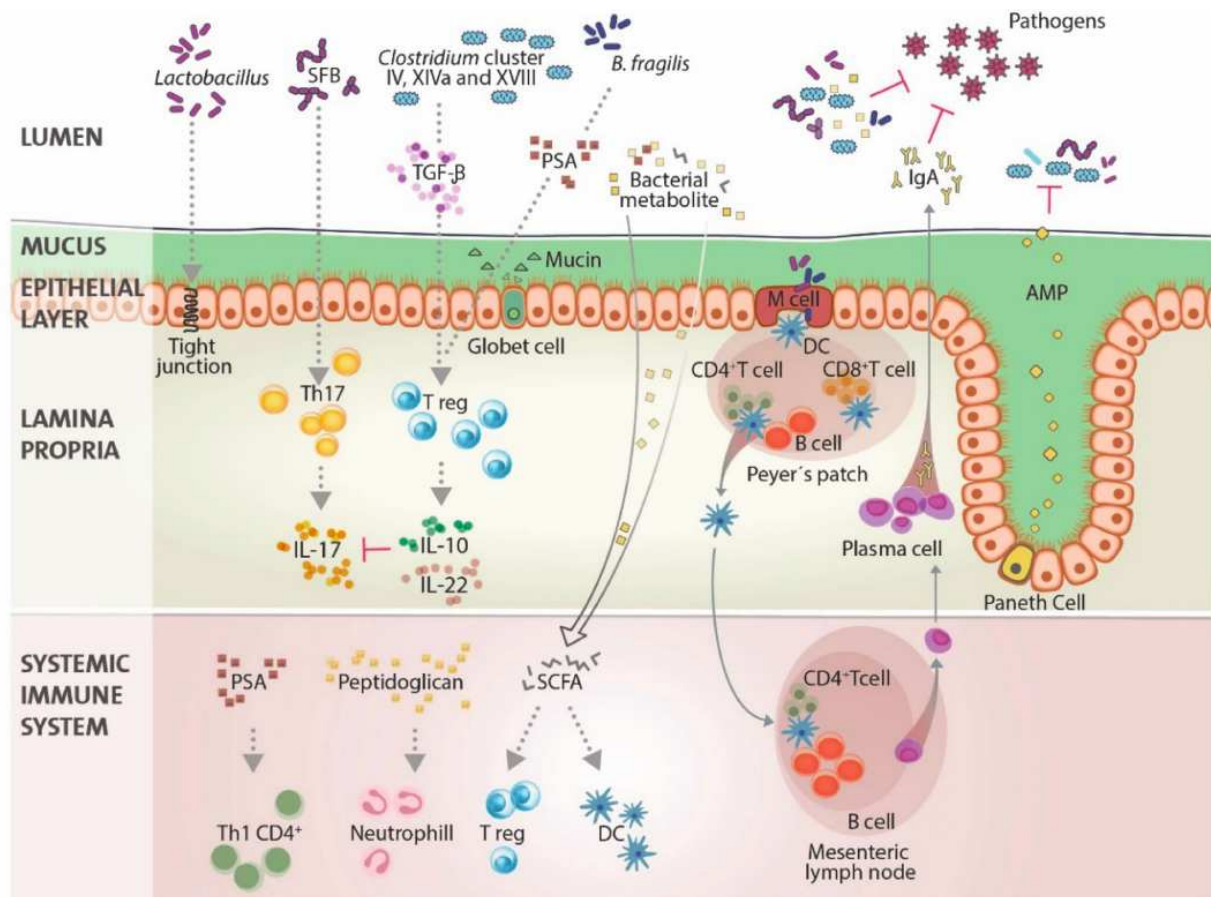
l'IFN $\gamma$  et de l'IL-17 dans l'intestin, ainsi que le développement de Th17 intestinaux<sup>253,255,256</sup>. Il a été montré, en présence de SFB, que les cellules épithéliales intestinales vont produire la protéine SAA (serum amyloid A) qui va agir sur les cellules dendritiques de la lamina propria qui en retour vont sécréter des cytokines impliquées dans la différenciation de Th17, notamment de l'IL-6 et de l'IL-23<sup>256</sup>. De plus, une étude chez des souris GF a montré que l'IL-1 $\beta$  produite, notamment par des macrophages intestinaux, est également importante dans la génération de Th17 intestinaux<sup>257</sup>.

Les études réalisées dans les modèles murins ont montré que la présence et la composition du microbiote impactaient également la génération de LT CD4 régulateurs (Treg) intestinaux. Au niveau des tissus intestinaux les Treg régulent la réponse immunitaire. En effet, le transfert adoptif de LT CD4 dans des souris dépourvues de Treg induit une inflammation au niveau de l'intestin (colite) qui n'est pas induite lorsque les LT CD4 sont transférés en présence de Treg<sup>258</sup>. Chez des souris traitées par antibiotiques ou GF, le nombre de Treg dans la lamina propria du côlon est très largement diminuée et la colonisation de ces souris GF avec une bactérie commensale humaine, *Bacteroides fragilis*, restaure la génération de Treg<sup>259,260,261</sup>. Les auteurs montrent que c'est une molécule produite par la bactérie, le polysaccharide A (PSA), qui stimule les TLR2 des LT CD4 pour induire le développement de Treg producteurs d'IL-10. Par ailleurs, la composition du microbiote peut aussi moduler les propriétés des LT CD4 de façon indirecte. Par exemple les cellules dendritiques (CD103+) de la lamina propria exposées à des bactéries peuvent induire la différenciation de LT CD4 naïfs en Treg via la production de TGF $\beta$ <sup>262</sup>.

Le microbiote intestinal peut également moduler les propriétés des LB notamment leur sécrétion d'IgA. La génération de LB producteurs d'IgA a lieu dans l'intestin au niveau des centres germinatifs des GALT où les LB se différencient en plasmocytes. Les cellules épithéliales de type M capturent des antigènes qui vont être reconnus par les cellules dendritiques. Les cellules dendritiques vont jouer un rôle important dans l'activation de LB IgA+ en transportant l'antigène au niveau des GALT où la réaction du centre germinatif se déroule. L'environnement des GALT, riche en TGF $\beta$ , en acide rétinoïque et en IL-21, favorise le switch isotypique en faveur d'une production d'IgA<sup>263,264</sup>. Les cellules dendritiques au niveau de la lamina propria ou dans les ILF sécrètent également des cytokines telles que du TNF $\alpha$ , BAFF, APRIL qui favorisent la production d'IgA par les LB<sup>265</sup>.

Les IgA produites en grande quantité dans l'intestin au niveau des GALT peuvent rejoindre la lumière intestinale via des protéines de transport, les pIgR (polymeric immunoglobulin receptor), exprimées par les cellules épithéliales intestinales. Les IgA sécrétées sont dimériques et se lient à des microbes ou des antigènes microbiens évitant ainsi la fixation d'éventuels pathogènes aux cellules épithéliales et l'invasion de la lamina propria<sup>266</sup>. Des études ont montré que les souris GF ont une concentration d'IgA dans le sérum et dans l'intestin fortement diminuée<sup>265</sup>. Chez l'homme, une déficience en IgA peut entraîner une augmentation des infections et le développement de pathologies auto-immunes<sup>267</sup>.

Les composants du système immunitaire peuvent altérer la composition du microbiote intestinal. En effet, il a été observé chez la souris, que la déficience en AID, une enzyme nécessaire pour la commutation de classe, impacte la génération d'IgA entraînant une altération de la composition du microbiote intestinal<sup>268</sup>. De plus, des mutations de l'enzyme AID peuvent mener à la production d'IgA de plus faible affinité altérant également la composition du microbiote<sup>269</sup>.



**Figure 12 : Communication entre le microbiote intestinal et les cellules immunitaires. D'après Uribe-Herranz et al, 2021<sup>270</sup>.**

La communication entre le système immunitaire et le microbiote intestinal est bidirectionnelle. En effet, la présence de certains microbes (par exemple SFB) et la sécrétion par ces microbes de certaines molécules (par exemple PSA) peuvent conduire à l'activation du système immunitaire. Les antigènes peuvent être capturés par les cellules dendritiques au niveau des PP grâce aux cellules de type M pour induire notamment la génération de plasmocytes sécréteurs d'IgA au sein des PP ou des MLN.

### C) Identification des lymphocytes intestinaux : le « gut homing »

Dans les GALT, les lymphocytes sont présents au niveau des sites inducteurs de la réponse immunitaire que sont les MLN et les PP. Ils sont aussi présents au niveau des sites effecteurs, dans la lamina propria, où ils participent à la régulation du microenvironnement intestinal.

La migration au sein des GALT fait intervenir des molécules d'adressages ou molécules de « homing » exprimées par les lymphocytes. La migration dépend également des ligands de ces molécules d'adressages exprimés au niveau des cellules endothéliales des vaisseaux sanguins intestinaux<sup>271</sup>.

Les LT et LB naïfs circulent en permanence entre le sang et les SLO pour rencontrer leur antigène. Ils expriment de façon constitutive l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  à un faible niveau. L'entrée des LT et LB naïfs dans les GALT fait intervenir les interactions entre : l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  exprimée par les LT et LB naïfs et MAdCAM-1 (Mucosal Addressin Cell Adhesion Molecule-1) exprimée par les HEV (high endothelial venules), l'expression de la L-sélectine (CD62L) par les lymphocytes naïfs et de son ligand, PNA<sub>d</sub> (peripheral lymph node addressin) exprimé par les HEV des PP et MLN. La migration implique également les chimiotactismes entre CCR7 exprimé par les lymphocytes naïfs et les chimiokines CCL19/CCL21 produites par les HEV ainsi que l'expression de l'intégrine  $\alpha L\beta 2$  par les lymphocytes et son ligand ICAM-1 exprimés par les HEV. Ces interactions moléculaires vont permettre le roulement des LT CD4 et LB naïfs le long des HEV, puis l'arrêt et l'adhésion des lymphocytes qui vont migrer à travers les HEV dans les PP ou les MLN<sup>271,272</sup>. Les LT et LB naïfs vont alors être activés par les DC mucoales intestinales. L'activation des LT CD4, LT CD8 et LB naïfs par ces DC va induire l'expression de CCR9 et une augmentation de l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  à leur surface<sup>273</sup>.

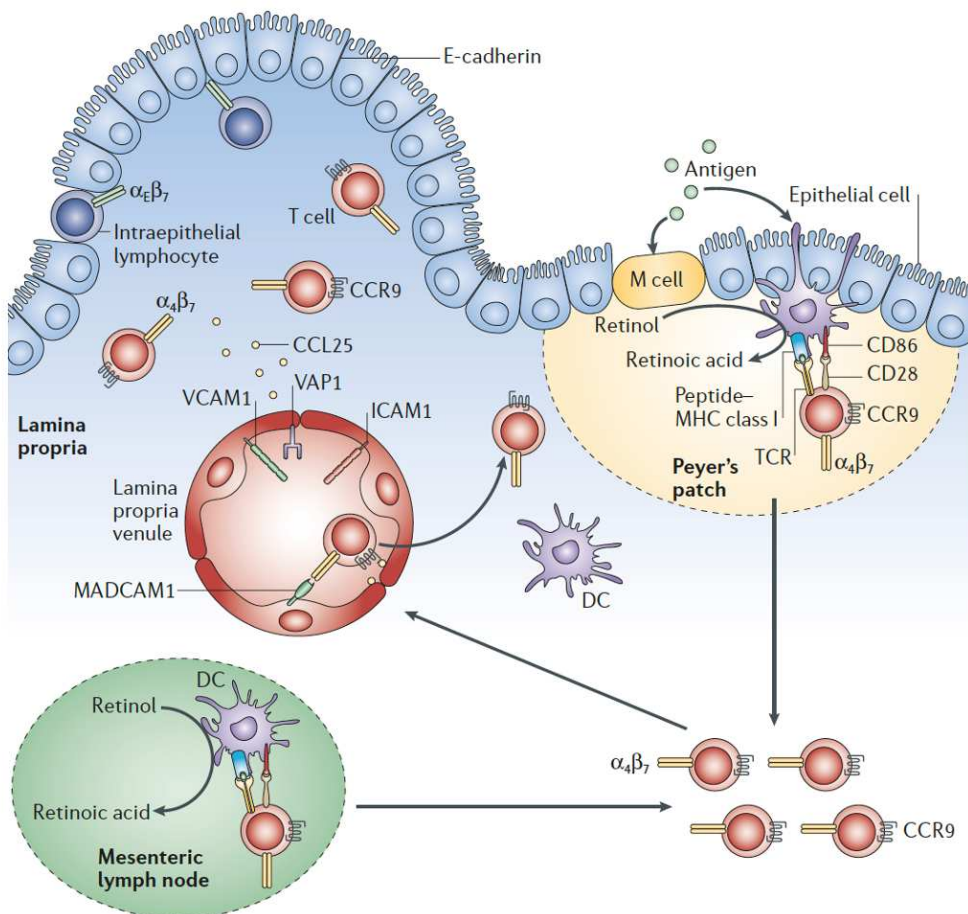
L'induction de l'expression de CCR9 et de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  par les DC mucoales intestinales CD103<sup>+</sup> est due au haut niveau d'expression de RALDH (retinal dehydrogenase)<sup>274</sup>. Cette enzyme permet, à partir de la vitamine A, la génération d'acide rétinoïque (RA) qui est nécessaire pour l'induction de l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  à haut niveau et de CCR9 à la surface des LT CD4, des LT CD8 et des LB<sup>264,271,273,275,276</sup>. Une étude a montré que des souris dépourvues de vitamine A avaient des LT CD4 effecteurs avec une expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  fortement diminuée ainsi qu'un faible nombre de lymphocytes au sein de la lamina propria sans modification des autres populations lymphocytaires dans l'organisme<sup>274</sup>. Les auteurs ont également observé que le RA était capable d'induire l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et de CCR9 sur des LT CD4 effecteurs, sans DC, *in vitro*. De plus, l'inhibition de la RALDH bloque l'induction de ces molécules d'adressage intestinal par les DC.

Une fois activés, ces LT CD4, LT CD8 et LB vont rejoindre la circulation sanguine dans laquelle leur haut niveau d'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  permet de les identifier comme lymphocytes d'origine intestinale. La forte expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et de CCR9 par les LT CD4, les LT CD8 et les LB circulants activés dans les GALT va leur permettre de retourner spécifiquement dans les GALT notamment au niveau de la lamina propria via l'interaction de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et de CCR9 avec MAdCAM-1 et CCL25 respectivement<sup>271</sup> (**Figure 13**). Le ligand de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , MAdCAM-1, est exprimé par les HEV des PP, des MLN ainsi que



par les veinules post-capillaires de la lamina propria de l'intestin grêle et du côlon. Une étude a montré l'importance de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  pour le développement de SLO. En effet, des souris déficientes en intégrine  $\alpha 4\beta 7$  ne présentent pas de défaut de développement des LT ou LB mais la formation des GALT y est impactée avec des PP et des MLN de plus petite taille, et une migration des LT CD4 et LB au sein de ces sites fortement diminuée<sup>277</sup>. Le ligand de CCR9, CCL25, est exprimé au niveau des cellules épithéliales intestinales de l'intestin grêle mais pas du côlon. Une étude montre de façon consistante que les DC du côlon, contrairement à celles de l'intestin grêle, n'induisent pas l'expression de CCR9 à la surface des LT CD4 et des LB<sup>278</sup>. La migration dans les GALT et la lamina propria des lymphocytes mémoires dépend donc de leur expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  et de CCR9, tandis que la rétention dans les sites intestinaux fait intervenir l'intégrine  $\alpha E\beta 7$ . L'intégrine  $\beta 7$  peut, en effet, s'associer avec l'intégrine  $\alpha 4$  ou l'intégrine  $\alpha E$  pour former en hétérodimère l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  ou l'intégrine  $\alpha E\beta 7$  respectivement.

Concernant l'expression de l'intégrine  $\alpha E\beta 7$ , des auteurs ont proposé que l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  à la surface des lymphocytes intestinaux est remplacée par celle de l'intégrine  $\alpha E\beta 7$  au niveau des sites effecteurs (**Figure 13**). Ce phénomène implique le TGF $\beta$  produit localement par les cellules épithéliales intestinales. En effet, le TGF $\beta$  induit l'augmentation de l'expression de l'ARNm des intégrines  $\alpha E$  et  $\beta 7$  tout en diminuant l'expression de l'ARNm de l'intégrine  $\alpha 4$ <sup>279</sup>. La rétention des lymphocytes au niveau des sites effecteurs de l'intestin est permise par l'expression du ligand de l'intégrine  $\alpha E\beta 7$ , l'E-cadhérine par les cellules épithéliales intestinales de la lamina propria<sup>271</sup>.



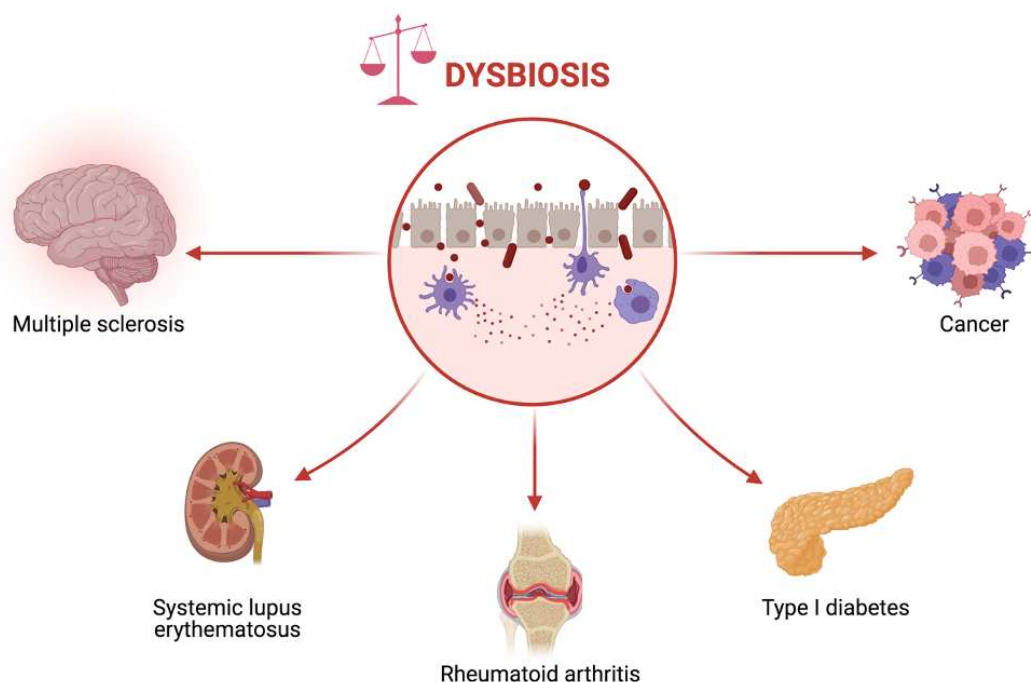
**Figure 13 : Génération du "gut homing" par les cellules dendritiques. D'après Adams et Eksteen, 2006<sup>280</sup>.**

L'induction de l'expression de l'intégrine  $\alpha_4\beta_7$  à la surface des LT CD4, LT CD8 et LB naïfs a lieu dans les sites inducteurs des GALT les PP et les MLN et fait intervenir les cellules dendritiques CD103+. Ces DC CD103+ ont la particularité d'exprimer la RALDH, qui produit du RA à partir de la vitamine A. En retour, les lymphocytes intestinaux activés par les DC CD103+ vont augmenter leur expression de l'intégrine  $\alpha_4\beta_7$  et de CCR9 et rejoindre la périphérie. Ils vont revenir dans les sites effecteurs de l'intestin notamment dans la lamina propria grâce à l'expression de MADCAM-1 et CCL25.

En plus de l'intégrine  $\alpha_4\beta_7$  et de CCR9, une autre molécule d'adressage intestinal a récemment été identifiée : GPR15 (G-protein-coupled-receptor). Une étude a montré que la prise d'antibiotique chez des souris entraîne la diminution de l'expression de GPR15 à la surface des Treg de la lamina propria<sup>281</sup>. Les auteurs montrent que l'expression de GPR15 est modulée par la composition du microbiote intestinal et le TGF $\beta$  mais pas par le RA. GPR15 est particulièrement exprimé au niveau du côlon notamment par des Treg et, de fait, des souris déficientes en GPR15 présentent une inflammation intestinale marquée au niveau du côlon. Cette inflammation est restaurée par le transfert de Treg exprimant GPR15.

## D) Implication des lymphocytes intestinaux dans des pathologies

Une dysbiose est observée dans de nombreuses pathologies, notamment auto-immunes, mais également chez des patients atteints de cancer (**Figure 14**).



**Figure 14 : Dysbiose dans le développement de pathologies.**

De nombreuses pathologies auto-immunes présentent une dysbiose indiquant une potentielle implication du microbiote intestinal dans leur développement. Une dysbiose est également observée chez certains patients avec un cancer ne répondant pas ou faiblement aux immunothérapies. Des lymphocytes intestinaux sont retrouvés dans des organes cibles extra-intestinaux des modèles murins de maladies auto-immunes : au niveau des articulations dans la polyarthrite rhumatoïde, dans les reins dans le lupus systémique érythémateux, dans le SNC dans la sclérose en plaques. Schéma réalisé à partir de BioRender.

### 1. Implication des lymphocytes intestinaux dans le cancer : succès des immunothérapies

Les mécanismes qu'utilisent les cellules cancéreuses pour échapper au système immunitaire sont les « immune checkpoint » incluant notamment l'axe PD1 (programme cell death) et PD-L1 (PD1 ligand). Des immunothérapies ciblant ces checkpoints ont été développées pour lever l'échappement immunitaire des cellules cancéreuses. Les anticorps dirigés contre PD1 et PD-L1 sont bénéfiques pour environ 40% des patients dans certains cancers (rénal, colorectal, mélanome)<sup>282</sup>. Des auteurs se sont alors intéressés aux mécanismes

responsables des échecs thérapeutiques chez les patients ne répondant pas aux immunothérapies. Des études chez la souris et chez l'homme ont montré que la composition du microbiote intestinal influence la réponse aux immunothérapies. Chez l'homme, la prise d'antibiotiques à spectre large entraînant une perturbation du microbiote intestinal diminue la réponse aux anti-PD1<sup>283</sup>. De façon consistante, les souris GF ou traitées avec des antibiotiques répondent moins bien aux anti-PD1 comparés aux souris possédant un microbiote intestinal intact<sup>283</sup>. Il a également été montré que la composition du microbiote intestinal diffère entre les patients atteints de mélanome métastatique qui répondent aux anti-PD1 et ceux qui n'y répondent pas<sup>284</sup>. Suites à ces observations, Routy et al., ont effectué des transferts de matières fécales (FMT) de patients qui répondent ou de patients qui ne répondent pas aux immunothérapies dans des souris GF et ont traité ces souris avec des anti-PD1<sup>283</sup>. Cette étude a montré que le traitement anti-PD1 était plus efficace chez les souris GF colonisées avec les FMT de patients répondeurs que chez les souris GF colonisées avec les FMT de patients non répondeurs. L'ajout d'une bactérie, *Akkermansia muciniphila* chez les souris colonisées avec les FMT de patients non-répondeurs permettait de restaurer l'efficacité des anti-PD1. De plus, ces souris supplémentées en *Akkermansia muciniphila* présentaient une augmentation du taux de LT CD4 infiltrés dans la tumeur exprimant la molécule d'adressage intestinal CCR9 ainsi que CXCR3, récepteur associé au profil Th1, indiquant que les lymphocytes intestinaux migrent au niveau du site cancéreux, suggérant que ces lymphocytes sont impliqués dans la réponse aux immunothérapies.

## 2. Implication des lymphocytes intestinaux dans les maladies auto-immunes

### a) Les maladies inflammatoires chroniques de l'intestin

Il a été observé une perturbation du microbiote intestinal chez des patients atteints de maladies inflammatoires chroniques de l'intestin (IBD) notamment la maladie de Crohn (CD)<sup>285,286</sup>. Ces pathologies sont caractérisées par la présence importante de lymphocytes inflammatoires dans l'intestin. Une augmentation de l'expression de MAdCAM-1, par les HEV des GALT, qui pourrait favoriser la migration des lymphocytes circulant qui expriment l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  au niveau de l'intestin, a été décrite chez les patients IBD<sup>287,288</sup>. Le profil inflammatoire des lymphocytes intestinaux dans les IBD a conduit au développement de thérapies ciblant ces lymphocytes, notamment à l'utilisation d'anticorps bloquant la migration

des lymphocytes dans l'intestin. Le premier anticorps autorisé pour traiter les IBD a été le Natalizumab, qui est dirigé contre la sous unité  $\alpha 4$  partagé par les intégrines  $\alpha 4\beta 7$  et  $\alpha 4\beta 1$ <sup>289</sup>. Cependant, la prise de Natalizumab entraîne une inhibition de la migration des lymphocytes dans le SNC et est donc associée à un risque de développer une leucoencéphalopathie multifocale progressive suite à la réactivation du virus de John Cunningham<sup>290,291</sup>. Un autre traitement est donc actuellement utilisé pour les IBD, le Vedolizumab, un anticorps monoclonal dirigé contre l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  possédant une bonne efficacité clinique <sup>292</sup>.

## b) La polyarthrite rhumatoïde

La PAR est une maladie auto-immune médiée notamment par des auto-anticorps présents dans le liquide synovial des articulations. Il a été observé une dysbiose chez les patients développant une PAR<sup>293</sup>. Dans le modèle murin SKG de la PAR, les transferts de matières fécales de patients PAR dans des souris GF induisent une pathologie plus sévère que lorsque les souris sont colonisées par transfert fécal de donneurs sains<sup>294</sup>. Une étude dans un autre modèle de la PAR, le modèle K/BxN, montre que des souris GF développent une pathologie atténuée<sup>295</sup>. La colonisation chez des souris GF par la bactérie SFB rétablit la sensibilité à la PAR via la génération de Th17 intestinaux induisant via l'IL-17 la production d'auto-anticorps par les LB <sup>295</sup>. Enfin, une autre étude utilisant la colonisation de souris GF avec la bactérie SFB montre l'implication des TFh intestinaux, dans le développement de la PAR<sup>296</sup>. En effet, les auteurs montrent que la monocolonisation de souris GF par la bactérie SFB induit une augmentation du nombre de TFh présents dans l'intestin mais aussi dans la rate et que ces TFh sont requis pour le développement de la PAR. De manière intéressante, la colonisation par SFB induit la différenciation de TFh au sein des PP, ainsi des TFh exprimant l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  sont retrouvés à distance de l'intestin, notamment dans la rate de souris PAR<sup>296</sup>. De plus, les auteurs confirment, par photoconversion, que des cellules des PP, notamment les TFh, migrent dans la rate des souris PAR. Les auteurs, en supprimant les PP chez les souris, montrent également que les TFh des PP sont essentiels pour le développement de la PAR dans ce modèle.

Ces données montrent que des lymphocytes intestinaux peuvent migrer dans des sites extérieurs à l'intestin et participer à la pathogenèse de maladies auto-immunes. Une migration de lymphocytes intestinaux dans les reins est également observée dans le modèle murin de glomérulonéphrites auto-immunes<sup>297</sup>.

## II- Implication des lymphocytes intestinaux dans la sclérose en plaques

La majorité des données portant sur l'implication du microbiote intestinal dans la SEP proviennent du modèle murin, le modèle EAE. En effet, des études ont montré que des souris traitées aux antibiotiques ainsi que des souris GF développaient une EAE atténuée<sup>298,299</sup>. L'atténuation de l'EAE s'accompagne d'une diminution de l'inflammation à la fois dans l'intestin et dans le SNC avec notamment une diminution de la sécrétion de cytokines inflammatoires telles que l'IL-17 et l'IFN $\gamma$ , et une augmentation de la proportion des Treg présents dans l'intestin et le SNC. La colonisation de souris GF par la bactérie SFB restaure la susceptibilité à l'EAE et impacte les propriétés des lymphocytes à la fois au niveau de l'intestin et du SNC en induisant une augmentation de l'inflammation dans l'intestin et le SNC via la restauration de la production d'IL-17 et l'IFN $\gamma$ <sup>298</sup>. En revanche, une étude montre que le PSA de la bactérie *Bacteroides fragilis* protège contre l'induction de l'EAE en favorisant la différenciation des Treg exprimant l'IL-10. Des souris déficientes en IL-10 perdent la protection conférée par la présence de PSA confirmant que la protection apportée par le PSA est dépendante de l'IL-10<sup>300</sup>.

Une altération dans la composition du microbiote intestinal a été observée chez les patients SEP en phase RRMS comparé à des sujets sains<sup>301</sup>. La composition du microbiote est également différente chez les patients en phase RRMS active comparé aux patients RRMS en période de rémission<sup>302</sup>. Dans un modèle murin spontané d'EAE récurrente-rémittente (souris SJL/J), une étude montre que le transfert de matière fécale de patients SEP en phase RRMS dans ces souris GF favorise le développement d'une EAE comparativement aux GF ayant reçu un FMT des jumeaux homozygotes sains des patients RRMS. Ces expériences indiquent que la composition du microbiote intestinal peut augmenter l'incidence du développement de l'EAE<sup>303</sup>.

Concernant les lymphocytes intestinaux, il a été observé dans des pathologies non-inflammatoires du SNC, la présence de LT CD4 exprimant l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  ( $\beta 7+$ ) et CCR9 (CCR9+) dans le LCR des patients<sup>304</sup>. Ces données indiquent que les cellules intestinales ont la capacité de migrer dans le SNC. Dans la SEP, une étude montre une diminution du pourcentage de LT CD4 CCR9+ circulant et une plus forte proportion de LT CD4 CCR9+ dans le LCR de patients en phase SPMS comparé à des sujets sains<sup>305</sup>. La proportion des LT CD4 CCR9+ exprimant le facteur de transcription ROR $\gamma$ t est en outre plus importante chez les patients en

phase SPMS comparés aux patients en phase RRMS et aux sujets sains, ce qui n'est pas le cas pour les LT CD4 CCR9<sup>-</sup>. De plus, les patients SPMS présentent un ratio, entre la production des cytokines IL-17 et IFN $\gamma$  par les LT CD4 CCR9<sup>+</sup> et celle par les LT CD4 CCR9<sup>-</sup>, plus élevé, indiquant un profil plus inflammatoire des LT CD4 CCR9<sup>+</sup> comparativement au LT CD4 CCR9<sup>-</sup> chez ces patients.

Deux études récentes se sont intéressées au rôle des LB et plasmocytes intestinaux dans la pathogénie du modèle EAE et dans la SEP. Une première étude montre la présence de plasmocytes IgA<sup>+</sup> dans le SNC de souris EAE<sup>217</sup>. De manière intéressante, les souris déficientes à la fois en plasmocytes et plasmablastes développent une EAE plus sévère. Les auteurs observent également une diminution des plasmocytes au niveau de la lamina propria durant les phases actives de l'EAE, avec une augmentation des plasmocytes dans le SNC suggérant que les plasmocytes IgA<sup>+</sup> migrent depuis l'intestin vers le SNC. En accord avec cette hypothèse, l'étude montre que les plasmocytes IgA<sup>+</sup> dans le SNC de souris ayant une EAE active sont dirigés contre un rotavirus retrouvé spécifiquement dans l'intestin, suggérant la migration des plasmocytes intestinaux dans le SNC de souris. De plus, ces plasmocytes IgA<sup>+</sup> régulent l'inflammation dans le SNC via la production d'IL-10. Ces données montrent donc un rôle protecteur des plasmocytes intestinaux sécrétant d'IgA dans l'EAE. Dans un autre modèle murin de la SEP, le modèle OSE (optico-spinal encephalomyelitis), il a été observé une implication de lymphocytes intestinaux. En effet, cette étude montre que la surexpression de Smad7, un inhibiteur du TGF $\beta$ , augmente la sévérité de la maladie, notamment en favorisant le développement de LT CD4 intestinaux inflammatoires. Les auteurs montrent que des LT CD4, surexprimant Smad7 et provenant de l'intestin, sont retrouvés dans des lésions du SNC chez des souris EAE, représentant jusqu'à 40% des LT CD4 présents dans les lésions de la moelle épinière<sup>306</sup>. De plus, des LT CD4 provenant de souris OSE traitées *in vitro* avec de l'acide rétinoïque (RA) pour induire l'expression de CCR9 et de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , induisent le développement d'une EAE plus sévère lorsqu'ils sont transférés *in vivo* comparé à des LT CD4 non traités avec du RA, indiquant que l'activation des LT CD4 dans les GALT est impliquée dans le développement de l'EAE.

Chez l'homme, des auteurs observent, à partir de l'analyse de matières fécales de patients RRMS actifs ou en rémission, une diminution des plasmocytes IgA<sup>+</sup> intestinaux se liant à des bactéries chez les patients en phase RRMS active. Ces données montrent chez

l'homme, une potentielle sortie des plasmocytes IgA<sup>+</sup> de l'intestin vers la périphérie<sup>217</sup>. De plus, une augmentation du niveau d'IgA ainsi que de plasmocytes exprimant l'IgA dans le LCR de patients en phase RRMS active, par rapport à des patients en phase RRMS inactive et des contrôles, a été décrite<sup>218</sup>. En accord avec les données observées chez la souris, les plasmocytes IgA<sup>+</sup> expriment de l'IL-10 dans le SNC des patients SEP. Les auteurs montrent également que des clones de LB et plasmocytes IgA<sup>+</sup> sont présents à la fois dans la circulation sanguine et le LCR, suggérant une migration de ces cellules depuis la périphérie vers le SNC. De manière intéressante, la majorité des plasmocytes IgA<sup>+</sup> dans le LCR de patients SEP exprime le gène qui code pour l'intégrine  $\beta 7$ . De plus, des plasmocytes IgA<sup>+</sup> dans le LCR réagissent contre des bactéries commensales intestinales et non contre des antigènes du SNC, confirmant que ces plasmocytes sont d'origine intestinale<sup>218</sup>. La présence de plasmocytes IgA<sup>+</sup> exprimant de l'IL10 dans le LCR de patients en phase RRMS suggère un potentiel rôle régulateur de ces cellules dans la SEP. Cependant, le potentiel rôle régulateur des plasmocytes IgA<sup>+</sup> n'exclut pas une implication des LB mémoires intestinaux dans l'inflammation dans la SEP puisque la dysbiose observée chez les patients en phase RRMS pourrait impacter les propriétés des LB intestinaux, en faveur d'un profil plus inflammatoire.

Les données recueillies chez les patients SEP et dans le modèle EAE montrent donc que la composition du microbiote intestinal impacte la pathologie de la SEP. La composition du microbiote intestinal est capable de modifier les propriétés des lymphocytes intestinaux qui ont la capacité de migrer dans le SNC dans le modèle EAE mais également chez les patients SEP. Cependant, l'implication des différentes populations de lymphocytes intestinaux et les mécanismes par lesquels ils impactent la pathogenèse de la SEP restent à être déterminés.

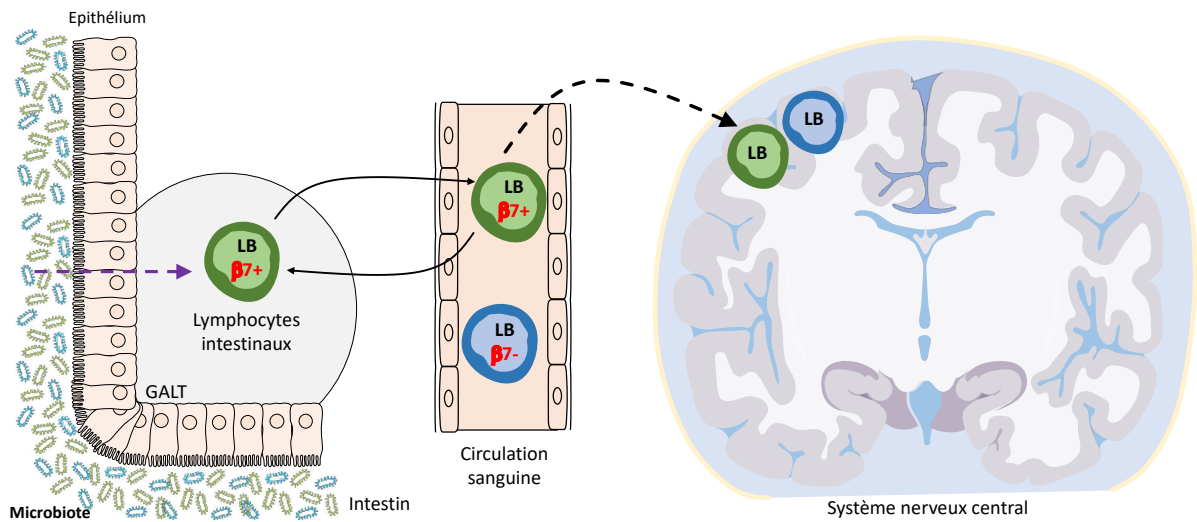


# Problématique et hypothèses

Nous venons de voir que la SEP est une maladie auto-immune, chronique et inflammatoire du SNC. Les causes du développement de la SEP sont multiples et peu connues. Cependant, des facteurs environnementaux semblent conférer une susceptibilité à la SEP. La compréhension des mécanismes immunitaires impliqués dans la pathogenèse de la SEP est nécessaire pour proposer de nouvelles options thérapeutiques, notamment pour empêcher le passage dans les phases les plus agressives de la maladie. Depuis une décennie, l'implication des LB dans la pathogénicité de la SEP a été étudiée suite à l'introduction des thérapies ciblant les LB. Par ailleurs, les études menées dans le modèle EAE ainsi que chez l'homme ont montré l'implication du microbiote intestinal et des lymphocytes intestinaux dans la maladie.

Notre hypothèse de travail est donc que **les LB dérivés de l'intestin sont pathogéniques dans la SEP (Figure 15)**. Ces cellules étant peu étudiées, il a été nécessaire, dans un premier temps, de les caractériser en conditions physiologiques chez des sujets sains pour ensuite déterminer si leurs propriétés sont impactées dans la SEP. Au cours de nos travaux, nous avons identifié les LB dérivés de l'intestin présents dans la circulation sanguine par leur expression de l'intégrine  $\beta 7$ . Pour caractériser les LB dans des conditions physiologiques et dans la SEP, nous nous sommes intéressés à leur **1) différenciation en plasmocytes et sécrétion d'anticorps, 2) sécrétion de cytokines pro- et anti-inflammatoires, et 3) capacité à orienter la polarisation des LT CD4**.

La caractérisation des LB dérivés de l'intestin chez les sujets sains pourrait permettre de préciser leur éventuelle implication dans des pathologies auto-immunes présentant une altération du microbiote intestinal. L'étude des propriétés des LB dérivés de l'intestin dans la SEP pourrait permettre la mise en évidence du rôle de nouveaux acteurs impliqués dans cette maladie complexe et multifactorielle.



**Figure 15 : Hypothèse sur l'implication des lymphocytes B dérivés de l'intestin dans la pathogénicité de la SEP.**

Nous formulons l'hypothèse que les LB dérivés de l'intestin sont pathogéniques dans la SEP. Le microbiote intestinal module les propriétés des lymphocytes intestinaux pouvant ainsi impacter les propriétés des LB exprimant l'intégrine  $\beta 7$  en faveur d'un profil inflammatoire. Ainsi, les LB intestinaux pourraient participer à l'inflammation, à la fois dans l'intestin, et/ou dans le SNC chez les patients SEP.

# Objectifs de la thèse

L'objectif de mes travaux de thèse a été d'étudier le rôle des lymphocytes dérivés de l'intestin, notamment les LB, dans la pathogenèse de la SEP. Les propriétés des LB dérivés de l'intestin étant peu décrites dans la littérature, je les ai, tout d'abord, caractérisés chez des sujets sains, en les identifiant dans la circulation sanguine par leur expression de l'intégrine  $\beta 7$ . Je me suis ensuite intéressé à leurs propriétés dans la SEP afin d'évaluer leur potentiel pathogénique dans les différentes phases de la maladie.

Je me suis également intéressé à l'effet du Natalizumab sur les propriétés des LT CD4 mémoires dérivés de l'intestin chez des patients SEP traités en phase RRMS.

Ma thèse comporte donc deux projets :

**Projet 1 :** Rôle des LB dérivés de l'intestin dans la pathogénicité de la SEP. Ce projet s'est effectué selon deux axes : 1) étude des propriétés phénotypiques et fonctionnelles des LB exprimant l'intégrine  $\beta 7$  chez les sujets sains et 2) étude de leurs propriétés chez les patients SEP.

**Projet 2 :** Étude des LT CD4 exprimant l'intégrine  $\beta 7$  chez les patients en phase RRMS sous Natalizumab. Un article présentant les résultats de ce projet a été soumis.

## Projet 1 : Rôle des lymphocytes B dérivés de l'intestin dans la pathogénicité de la SEP.

Les études sur le modèle murin de la SEP et sur les échantillons de patients atteints de SEP ont permis de mettre en évidence l'implication du système immunitaire et du microbiote intestinal dans la pathogénicité de la SEP. Le succès récent des immunothérapies anti-CD20 a permis d'identifier les LB comme des acteurs immunitaires clés impliqués dans la SEP. Dans ce contexte, nous avons émis l'hypothèse que les LB dérivés de l'intestin sont impliqués dans la pathogénèse de la maladie. Nous avons tout d'abord caractérisé, phénotypiquement et fonctionnellement, les différentes populations de LB dérivés de l'intestin chez les donneurs sains. Dans un second temps, nous avons étudié si leurs propriétés étaient impactées dans la SEP. L'obtention d'échantillons intestinaux étant limité aux pathologies associées à l'intestin, nous avons identifiés les LB dérivés de l'intestin dans la circulation sanguine par leur expression de l'intégrine  $\beta 7$ .

Nous avons tout d'abord étudié les propriétés phénotypiques et le profil cytokinique des LB CD27+IgD<sup>-</sup> et des LB CD27+IgD<sup>+</sup> exprimant l'intégrine  $\beta 7$  chez des individus sains. Nous observons que les LB CD27+IgD<sup>-</sup> dérivés de l'intestin produisent plus d'IgA notamment d'IgA2 par rapport aux LB CD27+IgD<sup>-</sup> non intestinaux. Nous montrons également que les LB CD27+IgD<sup>+</sup> exprimant l'intégrine  $\beta 7$  sécrètent des quantités plus importantes de cytokines inflammatoires et régulatrices que leurs homologues non intestinaux.

Nous avons ensuite étudié les propriétés des LB intestinaux chez les patients SEP. Nous avons constaté que les LB CD27+IgD<sup>-</sup> intégrine  $\beta 7$ <sup>+</sup> exprimaient plus l'IgA à leur surface lors des phases progressives de la maladie comparés aux patients RRMS et aux donneurs sains. Nous avons aussi déterminé que chez les patients RRMS possédant un pourcentage de LB CD27<sup>+</sup> totaux exprimant l'IL-6 plus élevé que les donneurs sains, le pourcentage de LB dérivés de l'intestin produisant de l'IL-6 était particulièrement augmenté comparativement à celui des LB ne dérivant pas de l'intestin.

En conclusion, les LB dérivés de l'intestin ont des propriétés différentes de celles des LB non intestinaux. Ces spécificités suggèrent que les LB intestinaux pourraient jouer un rôle clé dans diverses pathologies, particulièrement lorsqu'une altération du microbiote intestinal est observée. Les LB intestinaux pourraient ainsi participer à l'inflammation observé chez les patients SEP en phase RRMS mais également favoriser le développement et/ou le maintien des ELS en phase SPMS.

# Matériels et méthodes

## **Prélèvements de patients SEP et donneurs sains**

Les échantillons de sang de patients SEP et de donneurs sains sont prélevés dans des tubes de collecte de 7mL contenant un anticoagulant, l'EDTA (Éthylènediaminetétraacétique). Les échantillons de sang de donneurs sains sont obtenus auprès de l'Établissement Français du Sang (EFS). Les prélèvements de sang de patients SEP sont obtenus auprès du service de neurologie du CHU de Bordeaux (4 tubes) après consentement des patients (Protocole T4MS : accords du CPP Sud-Ouest et outre-mer III et du CPP Sud Méditerranée IV N° ID-RCB : 2021-A00099-32). Certains prélèvements de sang de patients SEP en phase RRMS proviennent également du CHU de Rennes. Les donneurs sains sont appariés aux patients SEP en fonction de l'âge et du sexe. Des couches leuco-plaquettaires sont également obtenues auprès de l'EFS pour les expériences impliquant un grand nombre de cellules de donneurs sains.

## **Analyse phénotypique des lymphocytes B par cytométrie en flux**

Après réception des échantillons sanguins, les PBMC sont isolés par gradient de densité (Ficoll). Le phénotype des LB circulants de patients SEP et de donneurs sains est effectué à l'aide des anticorps anti-IgD FITC (clone IA6-2), anti-IgM PerCP-Cy5-5 (clone MHM-88), anti-IgG PE (clone G18-145), anti-CD19 ECD (clone 53119), anti-CD38 PE-Cy7 (clone HIT2), anti-CD138 APC (clone MI15), anti-CD20 A700 (clone 2H7), anti-IgA biotine (clone G20-359), anti-CD27 pacific blue (clone M-T271), anti-intégrine  $\beta$ 7 BV605 (clone FIB504), anti-CD3 BV650 (clone UCTH1) et du marqueur de viabilité Zombie Aqua (Biolegend). Les PBMC sont incubés pendant 15 minutes à température ambiante dans l'obscurité. Les cellules sont ensuite lavées avec 150 $\mu$ l de PBS (tampon phosphate salin) puis incubées avec de la streptavidine APC-Cy7 pendant 10 minutes à l'obscurité à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS avant d'être suspendues dans du tampon FACS (PBS 1X ; 2mM EDTA ; 5% sérum de veau fœtal (SVF)) pour le passage en cytométrie en flux (BD LSRFortessa).

L'analyse des molécules de co-stimulations exprimées par les différentes populations des LB a été réalisée sur PBMC congelés provenant de donneurs sains ou de patients SEP. Après décongélation, les PBMC sont marqués par les anticorps anti-IgD FITC (clone IA6-2), anti-CD27 PerCP-Cy5-5 (clone M-T271), anti-CD80 PE (clone 2D10), anti-CD19 ECD (clone

53-119), anti-CD40 APC-Cy7 (clone 5C3), anti-CD86 BV421 (clone IT2.2), anti-intégrine  $\beta$ 7 BV605 (clone FIB504), anti-CD3 BV650 (clone UCTH1), anti-HLA-DR BV785 (clone L243), et le marqueur de viabilité Zombie Aqua. Les cellules sont ensuite lavées et suspendues dans du tampon FACS pour le passage en cytométrie en flux (LSRFortessa).

L'analyse des données de cytométrie en flux est réalisée sur le logiciel Flow-jo (BD Biosciences).

### **Marquage intracellulaire des cytokines exprimées par les lymphocytes B**

Après décongélation, les PBMC sont mises en culture ( $1 \times 10^6$  cellules/1mL/puits) en milieu RPMI (Roswell Park Memorial Institute medium) complet (10% SVF, 1% acides aminés non essentiels, 25 $\mu$ M d'hépès, 2mM de L-glutamine, 1mM de pyruvate de sodium, 100U/mL de pénicilline, 100U/mL de streptomycine et 50 $\mu$ M de  $\beta$ -mercaptoéthanol) contenant de la PMA (25ng/mg, Sigma Aldrich) et de la ionomycine (1 $\mu$ g/mL, Sigma Aldrich) et incubées à 37°C avec 5% de CO<sub>2</sub>. Après 1h30 d'incubation, de la Brefeldine A (5 $\mu$ g/mL) et de la monensine (GolgiStop, BD, 0,66 $\mu$ L/mL) sont ajoutés aux cultures. Après une incubation totale de 5 heures, les cellules sont marquées avec les anticorps : anti-CD19 ECD (clone 53119), anti-CD20 A700 (clone 2H7), anti-intégrine  $\beta$ 7 BV605 (clone FIB504), anti-CD27 BV650 (clone MT27) et anti-CD3 BV785 (clone UCTH1) et le marqueur de viabilité Zombie Aqua. Un anticorps anti-IgD PE-Cy7 (clone IA6-2) est ajouté dans certaines expériences. Après lavage, les cellules sont ensuite incubées durant 10 minutes avec une solution de fixation et perméabilisation (kit BD cytofix/cytoperm). Après lavage avec le tampon de perméabilisation Permash (kit BD cytofix/cytoperm), les cellules sont mises en présence des anticorps : anti-IL-6 FITC (clone MQ2BA5), anti-GM-CSF PerCPCy5.5 (clone BVD2-21C11), anti-LT $\alpha$  PE (clone 3598111), anti-TNF $\alpha$  APC (clone MAB11), anti-IFN $\gamma$  APC-Cy7 (clone 45B3), anti-IL-10 BV421 (clone JES39D7) dans du tampon Permash pendant 30 minutes dans l'obscurité et à température ambiante. Les cellules sont ensuite lavées deux fois avec du permash puis elles sont reprises dans du tampon FACS pour le passage en cytométrie en flux.

### **Purification des sous-populations de lymphocytes B**

Les LB sont tout d'abord enrichis par sélection positive immuno-magnétique (CD19 microbeads, Miltenyi) selon les instructions du fabricant. La fraction négative du tri CD19 est utilisée pour l'enrichissement en LT CD4 (cf purification des sous populations des LT CD4). La fraction CD19<sup>+</sup> est marquée avec des anticorps anti-IgD FITC (clone IA6-2), anti-CD27 PE

(clone L128), anti-intégrine  $\beta 7$  BV421 (clone FIB504) et anti-CD3 A700 (clone L128). En fonction des expériences réalisées, différentes populations de LB sont ensuite purifiées par tri en cytométrie en flux (BD FACSAria) : LB CD27+ exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  (CD3-CD27+ intégrine  $\beta 7+$  ou intégrine  $\beta 7-$ ) ou bien LB CD27+IgD- exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  (CD3-CD27+IgD- intégrine  $\beta 7+$  ou intégrine  $\beta 7-$ ) et LB CD27+IgD+ exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  (CD3-CD27+IgD+ intégrine  $\beta 7+$  ou intégrine  $\beta 7-$ ). La pureté des populations triées est supérieure à 97%.

### **Purification des sous-populations de lymphocytes T CD4**

Les LT CD4 mémoires sont enrichis par sélection négative immuno-magnétique (Memory CD4+ T cell isolation kit, Miltenyi) selon les instructions du fabricant à partir de la fraction négative du tri des LB (fraction CD19-). Les cellules enrichies en LT CD4 mémoires sont ensuite marquées avec les anticorps anti-CD4 BV421 (clone RPA-T4), anti-CD45RA APC-Cy7 (clone HI100), anti-intégrine  $\beta 7$  PE (clone FIB504), anti-CXCR5 A647 (clone RF8B2), anti-CD56 FITC (clone HCD56) et anti-CD8 FITC (clone RPA-T4) pour être triée par cytométrie en flux. A partir des cellules CD4+ CD45RA- CD56- CD8-, les LT CD4 folliculaires (TFh, CXCR5+) et non folliculaires (non-TFh, CXCR5-) provenant (intégrine  $\beta 7+$ ) ou non (intégrine  $\beta 7-$ ) de l'intestin sont isolés par cytométrie en flux à l'aide du trieur Aria. La pureté des populations triées est supérieure à 98%.

La purification de LT CD4 totaux pour les expériences de polarisation *in vitro* est réalisée à partir de PBMC par tri négatif immuno-magnétique (MojoSort™ Human CD4 T cell Isolation Kit, Biolegend). La fraction enrichie en LT CD4 totaux est ensuite marquée avec les anticorps : anti-CD4 BV421 (clone RPA-T4), anti-CD45RA ECD (clone 2H4), anti-CD56 FITC (clone HCD56) et anti-CD8 FITC (clone RPA-T4). Deux populations sont alors purifiées par cytométrie en flux à l'aide du trieur Aria : les LT CD4 naïfs (CD4+, CD45RA+, CD56- et CD8-) et les LT CD4 mémoires (CD4+, CD45RA-, CD56- et CD8-). La pureté des populations triées est supérieure à 98%.

### **Stimulation des sous populations de lymphocytes B**

Les sous types de LB comprenant les LB CD27+ (intégrine  $\beta 7+$  ou intégrine  $\beta 7-$ ) ou bien les LB CD27+IgD- et LB CD27+IgD+ exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  sont mis en culture avec du milieu RPMI complet contenant un anti-BCR (fragment F(ab')<sub>2</sub> anti-IgM, 10 $\mu$ g/mL, Jackson ImmunoResearch), du CD40 ligand soluble (CD40L, 100ng/mL, Enzo) et des

oligonucléotides CpG de classe B (ODN2006, 1 $\mu$ M, InvivoGen) dans une plaque 96 puits à fond rond (5x10<sup>4</sup> LB/puits ou pour les expériences incluant des patients SEP, 5x10<sup>3</sup> LB/puits). Pour l'étude du profil cytokinique des LB : après 48h de culture, le surnageant est récolté et stocké à -80°C. Pour les expériences de polarisation des LT CD4 : les LB sont stimulés sur la nuit pour ensuite être mis en culture avec des LT CD4. Pour l'étude de l'expression des molécules de co-stimulations : les LB CD27<sup>+</sup> (intégrine  $\beta$ 7<sup>+</sup> ou intégrine  $\beta$ 7<sup>-</sup>) sont récoltées après 48h de culture puis marqués avec les anticorps anti-IgD FITC (clone IA6-2), anti-CD27 PerCP-Cy5-5 (clone M-T271), anti-CD80 PE (clone 2D10), anti-CD19 ECD (clone 53-119), anti-CD40 APC-Cy7 (clone 5C3), anti-CD86 BV421 (clone IT2.2), anti-intégrine  $\beta$ 7 BV605 (clone FIB504), anti-CD3 BV650 (clone UCTH1), anti-HLA-DR BV785 (clone L243), et le marqueur de viabilité Zombie Aqua. Les cellules sont ensuite lavées et mises en suspension dans du tampon FACS pour le passage en cytométrie en flux (LSRFortessa).

Pour déterminer la capacité des sous-populations de LB à produire des anticorps et se différencier en plasmocytes, les sous types de LB comprenant les LB CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> et CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> dérivés ou non de l'intestin sont mis en culture avec du milieu RPMI complet comprenant de l'anti-IgM (10 $\mu$ g/mL), du CD40L soluble (100ng/mL) et de l'IL-21 (50ng/mL, PeproTech) dans une plaque 96 puits à fond rond (5x10<sup>4</sup> LB/puits). Après 6 jours de culture, le surnageant est récolté et stocké à -80°C pour doser les IgG et IgA et les cellules sont marquées avec les anticorps anti-CD19 PE (clone HIB19), anti-CD38 PE-Cy7 (clone HIT2), anti-CD138 APC (clone MI15) ainsi que le marqueur de viabilité Zombie Aqua pour analyser la différenciation des LB en plasmablastes et plasmocytes. Pour le passage en cytométrie, les cellules sont suspendues dans du tampon FACS contenant des microbilles fluorescentes de comptage (CountBright, Invitrogen) à raison de 1,02x10<sup>4</sup> billes/150 $\mu$ L afin de déterminer le nombre absolu de cellules par échantillon.

### **Polarisation des lymphocytes T CD4 naïfs et mémoires par les LB**

Les LT CD4 naïfs et mémoires (5x10<sup>6</sup> cellules/mL) sont stimulés avec des billes magnétiques recouvertes d'anticorps anti-CD3 et anti-CD28 à une concentration de 1,6 billes/10 cellules (Dynabeads<sup>TM</sup>, Gibco) dans des tubes en polypropylène (5x10<sup>6</sup> cellules/mL) dans du milieu RPMI complet pendant la nuit à 37°C. Les billes anti-CD3/CD28 sont ensuite enlevées avec un aimant et les cellules sont mise en culture avec chaque populations de LB (CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> intégrine  $\beta$ 7<sup>-</sup> ; CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> intégrine  $\beta$ 7<sup>+</sup> ; CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> intégrine  $\beta$ 7<sup>-</sup> ; CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> intégrine  $\beta$ 7<sup>+</sup>) préalablement activés (anti-IgM, CD40L, CpG) selon un ratio 1:1. Les cellules sont



cultivées dans des plaques 96 puits à fond plat dans un volume final de 200µL de milieu RPMI complet ( $2,5 \times 10^4$  LT CD4 avec  $2,5 \times 10^4$  LB). Après 4 jours de culture, les cellules sont stimulées avec de la PMA et de la ionomycine comme décrit précédemment (cf marquage intracellulaire des cytokines) afin d'analyser le profil cytokinique des LT CD4. Après 5h de culture, les cellules sont marquées avec le marqueur de viabilité Zombie Aqua et les anticorps anti-IL-10 FITC (clone JES3-9D7), anti-GM-CSF PerCP-Cy5-5 (clone BVD2-2C11), anti-Mip-1β PE (clone D21-1351), anti-IL-4 PE-Cy7 (clone MP4-25D2), anti-IL-21 A647, (clone 3A3N21), anti-IL-17F BV650 (clone 033-782), anti-IL-17A BV705 (clone BL168), anti-IL-2 A700 (clone MQ1-17H12), anti-IFNγ APC-Cy7 (clone 4SB3), anti-TNFα BV785 (clone MAb11), anti-CD19 ECD (clone 53119) et anti-CD4 BV605 (clone RPA-T4). Les cellules sont ensuite analysées par cytométrie en flux (LSR Fortessa).

### **Stimulation des sous-populations de LB par les non-TFh et les TFh.**

Les différentes populations de LT CD4 (intégrine β7- CXCR5- ; intégrine β7+ CXCR5- ; intégrine β7- CXCR5+ ; intégrine β7+ CXCR5+) sont mises en co-culture avec chaque population de LB (CD27+IgD- intégrine β7- ; CD27+IgD- intégrine β7+ ; CD27+IgD+ intégrine β7- ; CD27+IgD+ intégrine β7+) selon un ratio 1:1. Les cellules sont cultivées dans des plaques 96 puits à fond rond dans un volume final de 200µL de milieu RPMI complet ( $2 \times 10^4$  LT CD4 avec  $2 \times 10^4$  LB) en présence d'entérotoxine B staphylococcique (SEB, 1µg/mL, Toxin technology). Après 6 jours de culture, les surnageants sont récupérés et stockés à -80°C et les cellules sont marquées avec les anticorps anti-CD4 BV421 (clone RPA-T4), anti-CD3 PerCP-Cy5-5 (clone UCHT1), anti-CD19 PE (clone HIB19), anti-CD38 PE-Cy7 (clone HIT2), anti-CD138 APC (clone MI15) et le marqueur de viabilité Zombie Aqua pour déterminer la différenciation des LB en plasmablastes et plasmocytes. Pour le passage en cytométrie (Analyseur BD FACSCanto II), les cellules sont suspendues dans 200µL de tampon FACS contenant des microbilles fluorescentes de comptage (CountBright, Invitrogen) à raison de  $1,02 \times 10^4$  billes/200µL permettant ainsi de déterminer le nombre absolu de cellules par échantillon.

### **Dosage de la production de cytokines et molécules solubles dans les surnageants de cultures**

Les concentrations d'IL-2, IL-4, IL-6, IL-10, IL-13, IL-17A, IL-12p70, CD40L, APRIL, BAFF, TNFα, LTα et IFNγ sont mesurées par multiplex (LegendPlex Human B cell Panel,

Biolegend) selon les recommandations du fabricant. La lecture est réalisée sur un analyseur BD FACSCanto II. Les résultats sont ensuite analysés avec les logiciels FlowJo et GraphPad.

### **Dosage des sous-types d'immunoglobulines dans les surnageants de culture**

Les concentrations d'IgG, d'IgA, d'IgA1 et d'IgA2 dans le surnageant de culture de LB ou de co-culture LT CD4 et LB sont mesurées par ELISA. Des plaques 96 puits à fond plat sont « coatées » avec des anticorps de capture (Southern Biotechnology) anti-IgG, anti-IgA (4µg/mL), anti-IgA1 (2µg/mL) ou d'anti-IgA2 (10µg/mL) pendant une nuit puis les plaques coatées avec des anti-IgA1 et anti-IgA2 sont incubées avec du PBS contenant 1% de BSA (albumine de sérum bovin) pendant une heure. Les surnageants de culture dilués sont ensuite déposés dans les puits et incubés pendant 2 heures. Les puits sont alors lavés avec du PBS 0,05% Tween 20 puis incubés avec les anticorps secondaires anti-IgG-HRP ou anti-IgA-HRP pendant une heure ou 1h30 (pour les ELISA IgA1 et IgA2). Le substrat de la HRP, le TMB (tétraméthylbenzidine, Sigma) est ajouté dans les puits et la coloration est stoppé par de l'H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>. La lecture de la densité optique (DO 450nm et 570nm) se fait à l'aide du Varioskan (Thermo Scientific).

### **Microarray**

Les 4 populations de LB d'intérêts (CD27+IgD- intégrine β7- ; CD27+IgD- intégrine β7+ ; CD27+IgD+ intégrine β7- ; CD27+IgD+ intégrine β7+) sont isolées par tri cellulaire par cytométrie en flux à partir de PBMC de couche leuco-plaquettaire de 5 donneurs sains. Après isolation, les différentes populations de LB sont lysées dans du tampon de lyse SKP (kit RNA/DNA Purification Micro Kit, Norgen Biotek Corporation) contenant du β-mercaptoéthanol (143mM). L'ADN et l'ARN des cellules sont extraits suivant le protocole fourni par le kit RNA/DNA Purification Micro Kit de Norgen Biotek Corporation. L'ARN est envoyé à la plateforme GeT de Toulouse pour y réaliser un dosage quantitatif et qualitatif des échantillons d'ARN ainsi que pour exécuter l'hybridation sur puces à ARN (Human Clariom S assays, Thermo Fisher Scientific). Les résultats de l'expression des gènes sont analysés avec le logiciel Transcriptome Analysis Console software d'Affymetrix. L'analyse de l'implication des gènes différemment exprimés dans des voies de signalisation se fait grâce à la ressource Metascape.

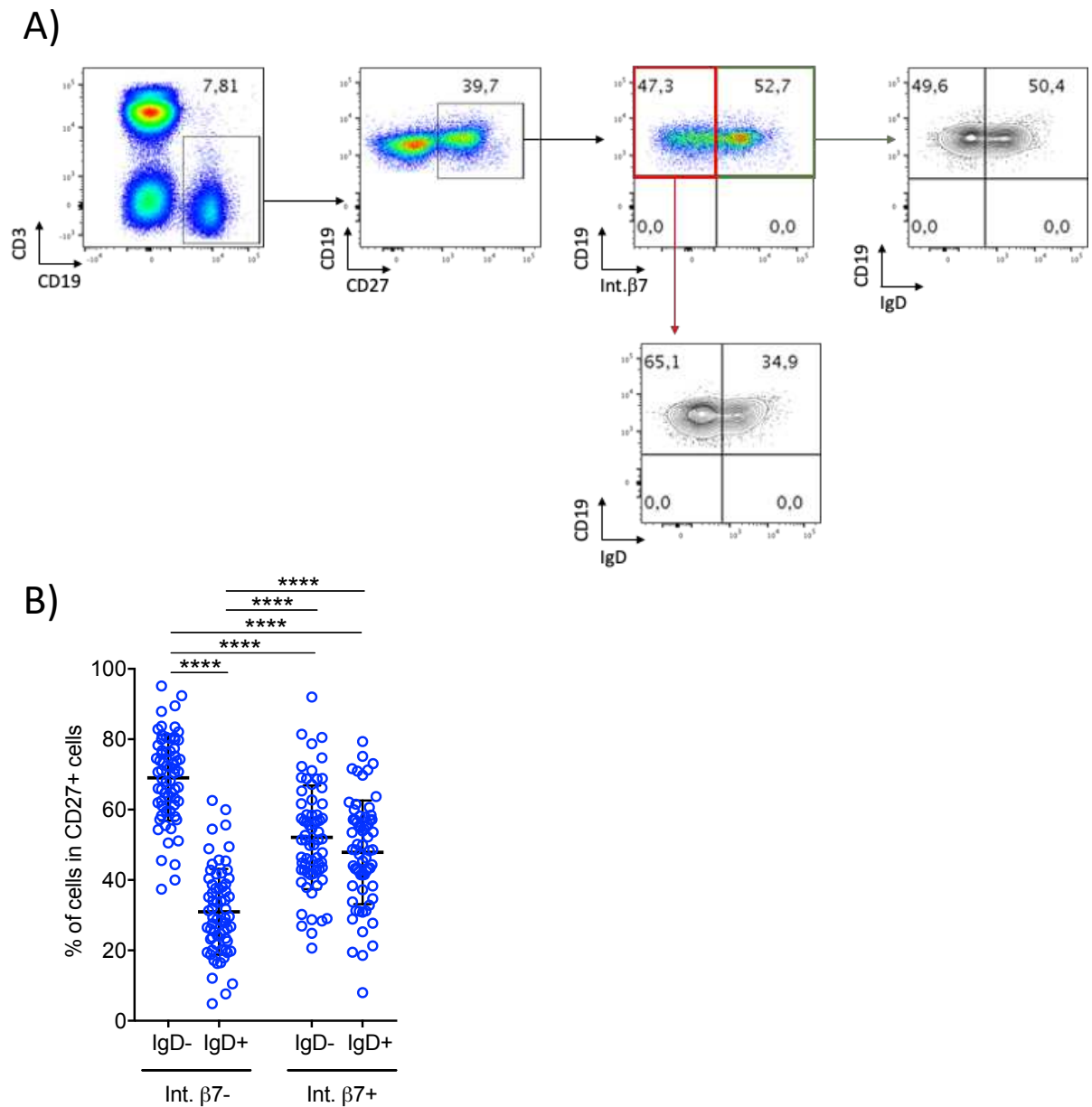
## **Analyse statistique**

Les tests statistiques et les représentations graphiques sont réalisés avec le logiciel GraphPad. Le T-test de Student est utilisé pour comparer les différences entre deux groupes appariés ou non appariés. Quand les données ne suivent pas la distribution de gaussienne, le test de Wilcoxon est effectué. Le test de Turkey (ANOVA à un facteur) est utilisé pour comparer différents groupes non appariés. Une p-value inférieure à 0,05 est considérée comme significative ; \*  $p < 0,05$  ; \*\*  $p < 0,01$  ; \*\*\*  $p < 0,001$  ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ .

# Résultats

**La proportion de LB CD27+IgD+ est plus importante parmi les LB CD27+ exprimant l'intégrine  $\beta$ 7, comparé aux LB CD27+ intégrine  $\beta$ 7- chez les donneurs sains.**

Les propriétés des LB dérivés de l'intestin sont peu décrites dans la littérature, nous avons tout d'abord caractérisé ces cellules chez les donneurs sains. L'obtention de prélèvement de l'intestin étant éthiquement limité aux pathologies impliquant cet organe et nécessitant une intervention, nous identifions les LB provenant de l'intestin dans le sang grâce à leur expression de l'intégrine  $\beta$ 7. En effet, l'expression de l'intégrine  $\beta$ 7 est induite chez les LB lors de leur activation par les cellules dendritiques des PP et des MLN. Les LB activés vont quitter ces organes pour entrer dans la circulation sanguine pour revenir par la suite spécifiquement au niveau des sites intestinaux grâce à l'expression de l'intégrine  $\beta$ 7 et de CCR9. Par cytométrie en flux, nous avons tout d'abord déterminé la proportion de LB CD27+IgD- et CD27+IgD+ présents dans les compartiments intégrine  $\beta$ 7- (Int.  $\beta$ 7-) et intégrine  $\beta$ 7+ (Int.  $\beta$ 7+) (**Figure 16A**) dans les PBMC de donneurs sains. Dans le compartiment Int.  $\beta$ 7-, la proportion de LB CD27+IgD-, décrit comme étant les LB mémoires, était plus importante que celle des LB CD27+IgD+, correspondant en majorité aux LB marginaux, (médiane  $\pm$  écart-type 70,73  $\pm$  12,18% vs 29,28  $\pm$  12,18% respectivement) (**Figure 16B**). En revanche, une proportion similaire de LB CD27+IgD- et LB CD27+IgD+ était observée dans le compartiment Int.  $\beta$ 7+ (médiane  $\pm$  écart type 51,43  $\pm$  14,74% vs 48,57  $\pm$  14,74% respectivement). Le compartiment Int.  $\beta$ 7+ comprend donc chez les donneurs sains une proportion plus importante de LB CD27+IgD+ et moins importante de LB CD27+IgD-comparativement aux compartiment Int.  $\beta$ 7-.



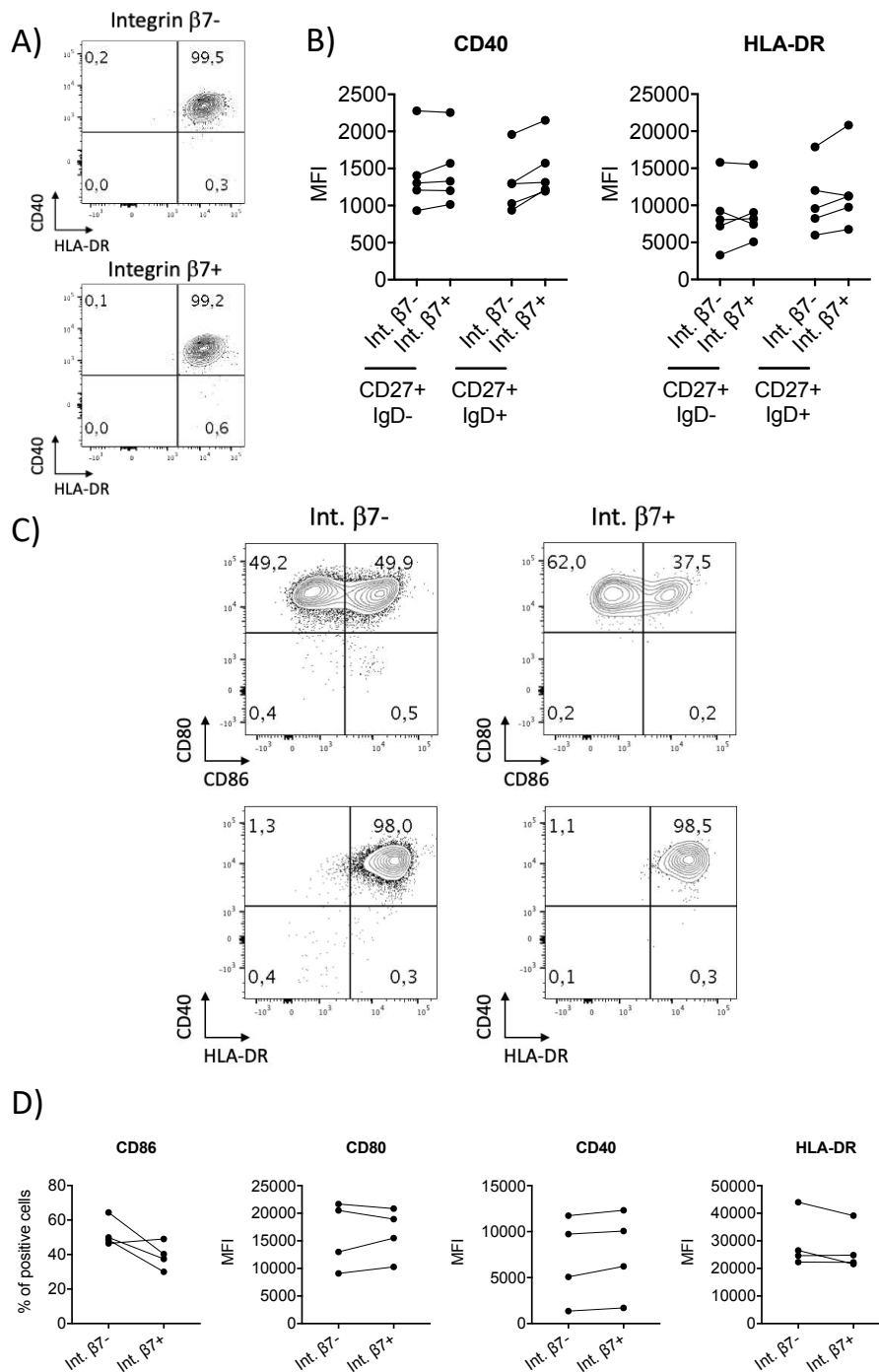
**Figure 16 : La proportion de LB CD27+IgD+ est plus importante dans le compartiment intégrine  $\beta 7+$  que dans le compartiment intégrine  $\beta 7-$  chez les donneurs sains.**

A) Stratégie de « gating » des LB CD27+IgD- et CD27+IgD+ parmi les LB CD27+ exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$ .

B) Pourcentages de LB CD27+IgD- et CD27+IgD+ parmi les LB CD27+ exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$ . One-way ANOVA (Test de Tukey), \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ,  $n = 66$ .

**Les LB CD27+IgD- et les LB CD27+IgD+ dérivés ou non de l'intestin expriment à un niveau similaire CD40, CD80, CD86 et HLA-DR chez les donneurs sains.**

Pour étudier la fonction de cellules présentatrice d'antigène des différentes populations de LB provenant de l'intestin, nous avons comparé par cytométrie en flux leur expression des molécules de co-stimulations (CD80, CD86, CD40 et HLA-DR) à celle des LB Int.  $\beta$ 7-. Nous avons observé que CD40 et HLA-DR étaient exprimés par la totalité des LB des quatre sous-populations sans différence de niveaux d'expression (**Figure 17A** et **17B**), alors que l'expression de CD80 et de CD86 n'était pas détectable (données non montrées). Nous avons ensuite activé les LB CD27+ Int.  $\beta$ 7- ou Int.  $\beta$ 7+ in vitro avec une stimulation CD40, CpG et BCR et déterminé l'expression de CD80, CD86, CD40 et HLA-DR après 48h de culture. Dans ces conditions, nous avons observé une augmentation de expression de CD80 et CD86 ainsi que de CD40 et HLA-DR par les LB CD27+ (**Figure 17C**). En revanche, aucune différence de pourcentages d'expression et du niveau d'expression de ces molécules n'a pu être détectée entre les LB CD27+ Int.  $\beta$ 7- et Int.  $\beta$ 7+ (**Figure 17D**). Ces données suggèrent qu'une éventuelle différence dans la fonction CPA au sein des LB CD27+ dérivés ou non de l'intestin n'est pas due à une différence d'expression des molécules étudiées.



**Figure 17 : L'expression des molécules de co-stimulations CD40 et HLA-DR est similaire à la surface des LB CD27+IgD- et CD27+IgD+ exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  chez les donneurs sains.**

- A) Données de cytométrie représentatives de l'expression de CD40 et HLA-DR parmi les LB CD27<sup>+</sup> exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  chez les donneurs sains.
- B) Moyennes d'intensité de fluorescence (MFI) de l'expression de CD40 et HLA-DR par les LB CD27<sup>+</sup> IgD<sup>-</sup> et LB CD27<sup>+</sup> IgD<sup>+</sup> exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$ , n=5.
- C) Données de cytométrie représentatives de l'expression de CD80, CD86, CD40 et HLA-DR par les LB CD27<sup>+</sup> exprimant (à droite) ou n'exprimant pas (à gauche) l'intégrine  $\beta 7$  après 2 jours de culture en présence de CD40L, CpG et anti-BCR.
- D) Pourcentages d'expression de CD86 et MFI de l'expression de CD80, CD40 et HLA-DR par les LB CD27<sup>+</sup> exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  après 2 jours de stimulation, n=4.

**Chez les donneurs sains, les LB CD27+IgD- et les LB CD27+IgD+ dérivés de l'intestin se différencient moins en plasmocytes mais produisent plus d'IgA2 comparé à leurs homologues ne provenant pas de l'intestin.**

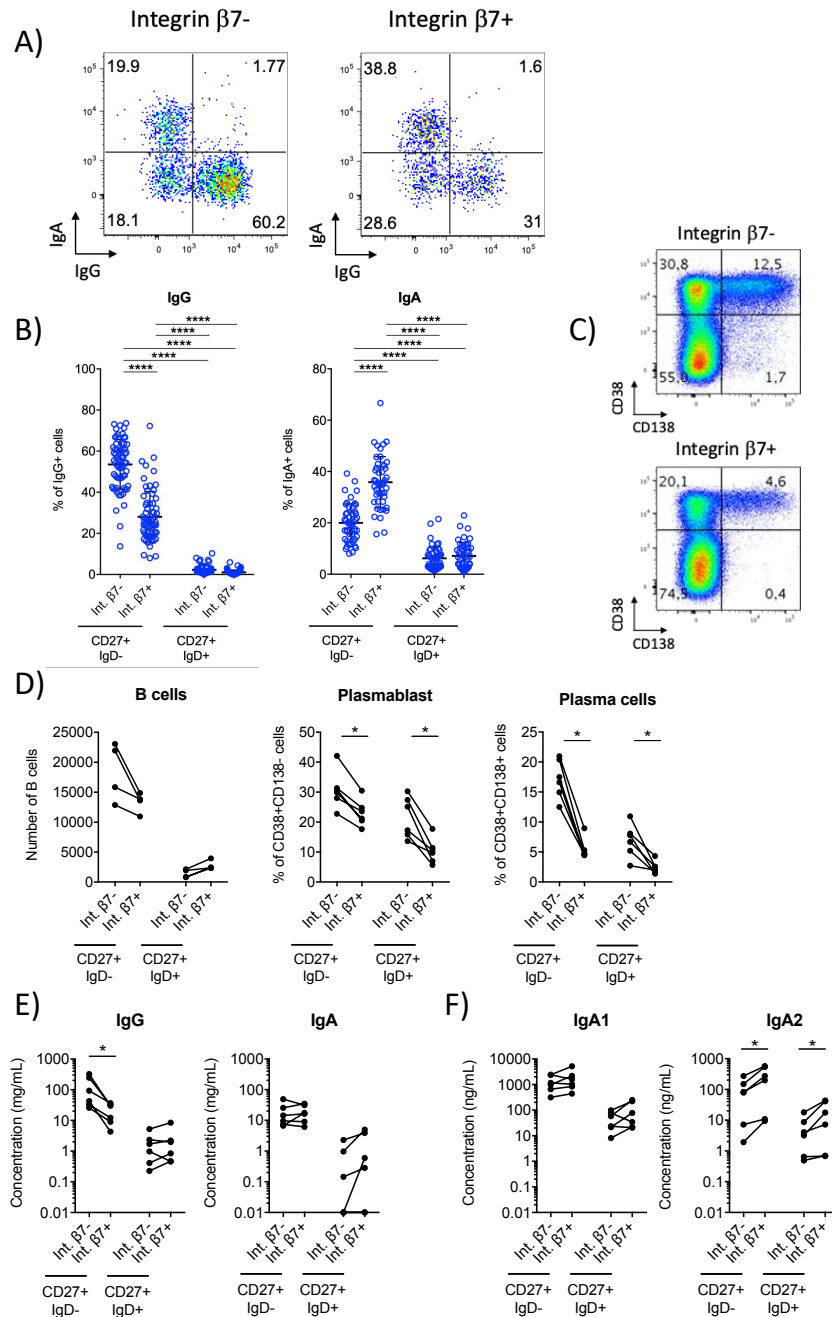
Nous nous sommes ensuite intéressé à l'expression de surface et à la capacité de sécrétion des IgG et IgA des LB exprimant l'intégrine  $\beta 7^+$ . Pour cela, nous avons tout d'abord déterminé par cytométrie en flux les pourcentages des différentes populations de LB CD27+ provenant ou non de l'intestin exprimant des IgG et IgA à leur surface (**Figure 18A**). Comme attendu, nous avons observé une faible expression d'IgG et d'IgA à la surface des LB CD27+IgD+ qu'ils proviennent ou non de l'intestin (**Figure 18B**). Concernant les LB CD27+IgD-, nous avons observé une plus faible proportion de cellules exprimant des IgG dans le compartiment Int.  $\beta 7^+$  que dans le compartiment Int.  $\beta 7^-$  (médiane  $\pm$  écart-type 24,95  $\pm$  12,33% vs 54,86  $\pm$  12,16% respectivement) (**Figure 18B**). Au contraire, une plus forte proportion de LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7^+$  exprimait des IgA à leur surface comparé aux LB CD27+IgD- ne provenant pas de l'intestin (médiane  $\pm$  écart-type 35,41  $\pm$  9,99% vs 19,83  $\pm$  7,4% respectivement) ce qui est en accord avec la concentration élevée d'IgA présente au niveau des intestins<sup>307</sup>.

Nous nous sommes ensuite intéressé à la capacité de ces différentes populations de LB à se différencier en cellules productrices d'anticorps et à sécréter des IgG et des IgA. Pour cela, les 4 populations de LB (CD27+IgD- Int.  $\beta 7^-$ ; CD27+IgD- Int.  $\beta 7^+$ ; CD27+IgD+ Int.  $\beta 7^-$ ; CD27+IgD+ Int.  $\beta 7^+$ ) ont été triées par cytométrie en flux et cultivées avec du CD40L, de l'anti-BCR et de l'IL-21. Après 6 jours de culture, les surnageants ont été récoltés et la différenciation des LB en plasmablastes (CD38+,CD138-) et en plasmocytes (CD38+,CD138+) a été déterminée par cytométrie en flux (**Figure 18C**). Le nombre absolu de cellules contenues dans les puits de culture des LB CD27+IgD+ provenant ou non de l'intestin était largement inférieur aux nombres de cellules contenues dans les puits des LB CD27+IgD- indiquant que dans ces conditions de culture, les LB CD27+IgD+ survivent et/ou prolifèrent moins que les LB CD27+IgD- (**Figure 18D**). Concernant les LB CD27+IgD-, nous avons observé un plus faible nombre de LB dans les cultures de LB Int.  $\beta 7^+$  comparé aux cultures de LB Int.  $\beta 7^-$ . Les pourcentages de LB s'étant différenciés en plasmablastes et plasmocytes étaient plus faibles au sein des cultures de LB Int.  $\beta 7^+$  (CD27+IgD- et CD27+IgD+) qu'au sein des cultures l'intégrine  $\beta 7^-$ . Ces résultats montrent que les LB CD27+IgD- et LB CD27+IgD+ ont une plus faible capacité à proliférer mais aussi à se différencier en cellules sécrétrices d'anticorps lorsqu'ils proviennent de l'intestin. Concernant la production d'IgG et d'IgA, de manière attendue, celle-



ci était plus importante par les LB CD27+IgD- que pour LB CD27+IgD+. De plus, la quantité d'IgG produite par les LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7+ était moins importante que celle produite par les CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7- alors que celle d'IgA était équivalente pour les deux types cellulaires malgré un nombre de plasmocytes moins important dans les cultures de LB exprimant l'intégrine  $\beta$ 7 (**Figure 18E**). Nous nous sommes ensuite demandé si les LB intestinaux produisaient de façon préférentielle un sous type d'IgA par rapport aux LB Int.  $\beta$ 7-. Nous avons observé que les LB Int.  $\beta$ 7+ (CD27+IgD- et CD27+IgD+) produisaient les IgA2 en plus forte quantité comparativement aux LB Int.  $\beta$ 7- alors que la production d'IgA1 ne différait pas (**Figure 18F**).

L'ensemble de ces données montrent que les LB intestinaux ont une capacité de différenciation en plasmocytes plus faible que les LB non intestinaux tout au moins dans nos conditions expérimentales. Néanmoins, les LB intestinaux IgD-CD27+ et IgD+CD27+ sécrètent plus d'IgA notamment des IgA2 que leurs homologues n'exprimant pas l'intégrine  $\beta$ 7 ce qui est en adéquation avec leur localisation intestinale<sup>46</sup>.



**Figure 18 : Les LB CD27+IgD- intestinaux (Int.  $\beta 7^+$ ) sécrètent moins d'IgG et plus d'IgA2 comparé à leurs équivalents n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$  chez les donneurs sains.**

A) Données de cytométrie représentatives de l'expression membranaire de IgA et IgG par les LB CD27<sup>+</sup> dérivant (intégrine  $\beta 7^+$ ) ou non (intégrine  $\beta 7^-$ ) de l'intestin.

B) Pourcentages de LB CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> et CD27<sup>+</sup>IgD<sup>+</sup> intégrine  $\beta 7^-$  ou intégrine  $\beta 7^+$  exprimant des IgG et des IgA à leur surface. One-way ANOVA (Test de Tukey), \*\*\*\* $p < 0,0001$ ,  $n = 47$ .

C) Stratégie de « gating » des plasmablastes (CD38<sup>+</sup>, CD138<sup>-</sup>) et plasmocytes (CD38<sup>+</sup>, CD138<sup>+</sup>) après 6 jours de culture des LB CD27<sup>+</sup>IgD<sup>-</sup> dérivant ou non de l'intestin en présence de CD40L, IL-21 et anti-BCR.

D) Nombre absolu de LB par puits de culture et pourcentages de plasmablastes et plasmocytes parmi les LB après 6 jours de culture en présence de CD40L, IL-21 et anti-BCR. T-Test de Student apparié, \* $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

E) Concentration d'IgG et d'IgA (mg/mL) dans les surnageants après 6 jours de culture en présence de CD40L, IL-21 et anti-BCR. T-Test de Student apparié, \* $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

F) Concentration d'IgA1 et IgA2 (ng/mL) dans les surnageants après 6 jours de culture en présence de CD40L, IL-21 et anti-BCR. T-Test de Student apparié, \* $p < 0,05$ ,  $n = 6$ .

## **Les TFh dérivés ou non de l'intestin de donneurs sains aident efficacement les LB CD27+IgD- et CD27+IgD+ dérivés de l'intestin mais ne modifient pas leurs propriétés intrinsèques.**

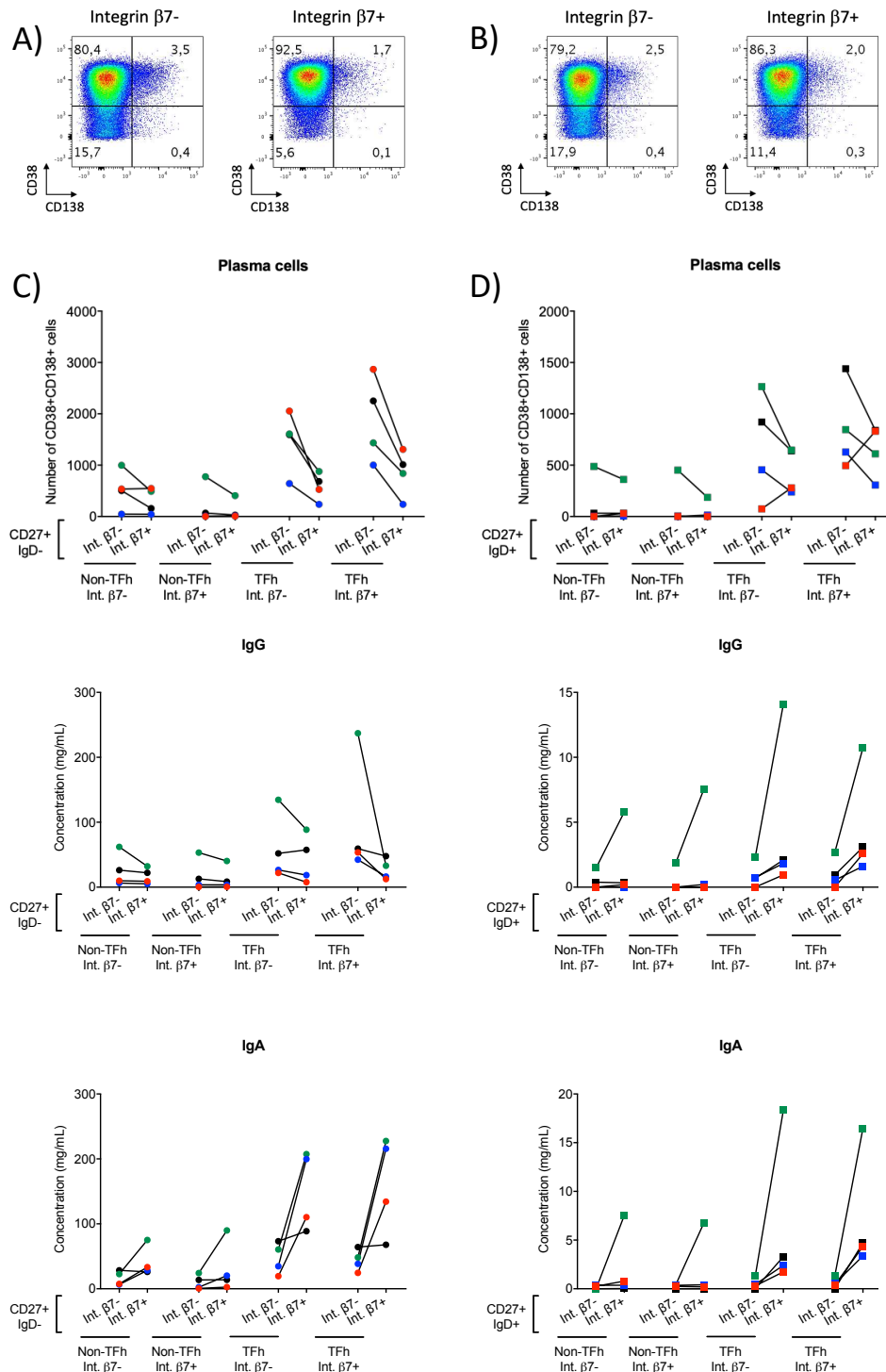
Nous avons observé une plus faible sécrétion d'IgG et une plus forte sécrétion d'IgA2 par les LB dérivés de l'intestin par rapport aux LB non intestinaux lorsqu'ils étaient stimulés *in vitro* avec un anti-BCR, du CD40L et de l'IL-21. Nous nous sommes alors demandé si les TFh, cellules spécialisées dans l'aide aux LB, pouvaient impacter, en fonction de leur origine intestinale ou non, la différenciation des différentes populations de LB et leur production d'IgG et d'IgA. Pour cela, nous avons réalisé des co-cultures croisées entre 4 populations de LT CD4 mémoires (TFh ou non TFh dérivant ou non de l'intestin) et les 4 populations de LB étudiées. Chaque population de non-TFh (Int.  $\beta 7^-$  CXCR5 $^-$  ; Int.  $\beta 7^+$  CXCR5 $^-$ ) et de TFh (Int.  $\beta 7^-$  CXCR5 $^+$  ; Int.  $\beta 7^+$  CXCR5 $^+$ ) a donc été isolée par cytométrie en flux et mise en co-culture avec chaque population de LB : CD27+IgD- Int.  $\beta 7^-$  ; CD27+IgD- Int.  $\beta 7^+$  ; CD27+IgD+ Int.  $\beta 7^-$  et CD27+IgD+ Int.  $\beta 7^+$ . Un super-antigène, le SEB a été ajouté aux cultures pour favoriser l'interaction entre les LT CD4 et les LB. Après 6 jours de culture, la différenciation des LB (CD3 $^-$ , CD19 $^+$ ) en plasmocytes (CD38 $^+$ , CD138 $^+$ ) a été analysée par cytométrie en flux (**Figure 19A** et **19B**) et les concentrations d'IgG et d'IgA présentes dans les surnageants ont été mesurées par ELISA.

Concernant les co-cultures avec les LB CD27+IgD- (**Figure 19C**), nous avons observé un plus faible nombre de plasmocytes et une plus faible sécrétion d'IgG et d'IgA lorsque les LB CD27+IgD- étaient mis en culture avec les non-TFh comparé aux cultures avec les TFh, ce qui est en accord avec les données de la littérature<sup>237</sup>. Dans les conditions de co-cultures avec les TFh, nous avons observé un plus faible nombre de plasmocytes lorsque les LB CD27+IgD- exprimaient l'intégrine  $\beta 7$ . Par contre, nous n'avons pas observé de différence selon l'origine intestinale ou non des TFh dans leur capacité à induire la différenciation des LB CD27+IgD- en plasmocytes.

La concentration d'IgG dans les surnageants de cultures des LB CD27+IgD-, lorsque ceux-ci sont stimulés par les TFh dérivés ou non de l'intestin, était globalement plus faible pour les LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7^+$  que pour les LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7^-$ . La production d'IgA était par contre plus importante chez les LB CD27+IgD- dérivés de l'intestin comparé aux LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7^-$  lorsqu'ils étaient en culture avec des TFh. Tout comme pour la différenciation en plasmocytes, nous n'avons pas observé de différence de niveaux de sécrétion d'IgG ou d'IgA en fonction de l'origine intestinale ou non des TFh.

Concernant les cultures de LB CD27+IgD+ (**Figure 19D**), nous avons observé un taux de plasmocytes ainsi qu'une concentration d'IgG et d'IgA plus faible comparé aux cultures de LB CD27+IgD-. Nous avons également observé de manière générale un plus grand nombre de plasmocytes et une sécrétion d'Ig plus importante lorsque les LB CD27+IgD+ étaient mis en culture avec des TFh comparé à la culture avec des non-TFh. Contrairement aux LB CD27+IgD-, nous avons observé que la stimulation par les TFh induisait une plus forte sécrétion d'IgG par les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ que par les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7-. Par contre similairement aux LB CD27+ IgD-, nous avons observé, en présence de TFh, une production d'IgA plus importante dans le surnageant de culture des LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ comparé aux LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7-. Comme pour les LB CD27+IgD-, les propriétés des LB CD27+IgD+ ne semblaient pas modifiées par l'origine intestinale ou non des TFh.

Les propriétés des LB CD27+IgD- et des LB CD27+IgD+ intestinaux sont donc conservées lors d'une restimulation de ces cellules par des TFh puisque nous observons, comme lors de la stimulation anti-BCR, CD40L, IL-21 (**Figure 18**), une moindre prolifération et différenciation en plasmocytes des LB Int.  $\beta$ 7+ associés à une production plus élevée d'IgA, ceci indépendamment de l'origine intestinale ou non des TFh.



**Figure 19 : Les LB CD27+IgD- et CD27+IgD+ provenant de l'intestin restimulés par des TFh se différencient moins efficacement en plasmocytes que leurs homologues intégrine  $\beta7^-$  mais secrètent de plus importantes quantités d'IgA chez les donneurs sains.**

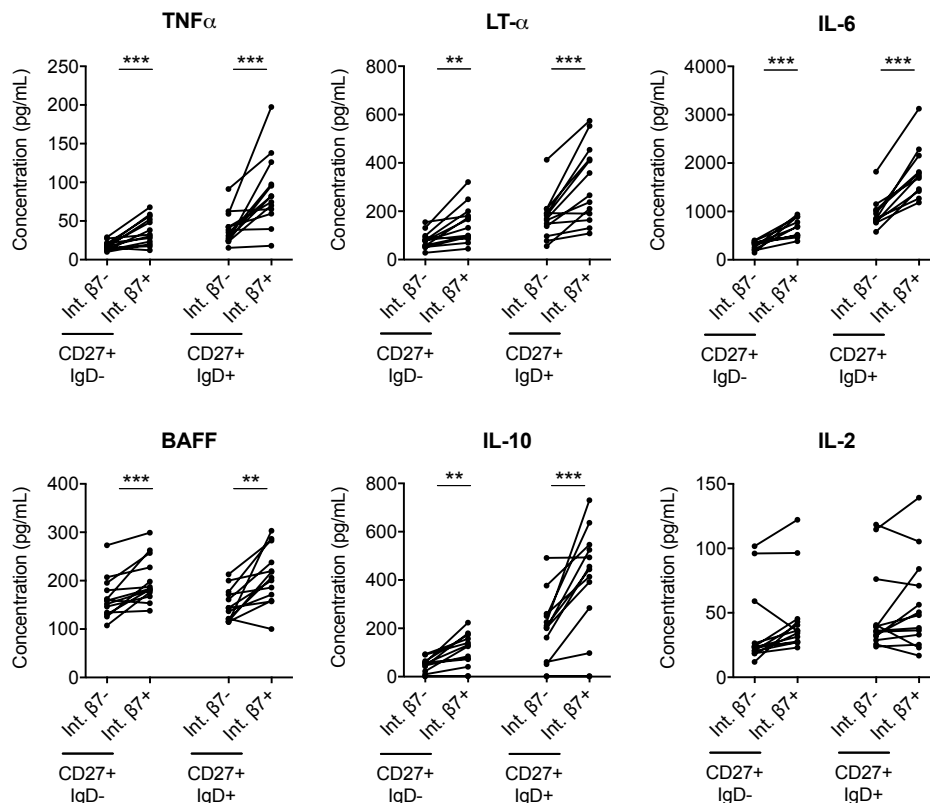
A-B) Données de cytométrie en flux représentatives de la différenciation en plasmablastes et plasmocytes après 6 jours de cultures des LB CD27+IgD- (A) et des LB CD27+IgD+ (B) provenant ou non de l'intestin cultivés avec des TFh intestinaux en présence de SEB. Les co-cultures sont réalisées avec un ratio 1:1 (20 000 LT CD4 et 20 000 LB par puits de culture).

C-D) Nombre absolu de plasmocytes par puits de culture et concentration d'IgG et d'IgA dans les surnageants après 6 jours de co-cultures des différentes populations de LT CD4 avec les LB CD27+IgD- (C) ou LB CD27+IgD+ (D) exprimant ou non l'intégrine  $\beta7$ .

**Les LB CD27+IgD- et LB CD27+IgD+ dérivés de l'intestin sécrètent des quantités plus élevées de cytokines pro- et anti-inflammatoires que leurs homologues n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$  chez les donneurs sains.**

Nous avons ensuite poursuivi la caractérisation des LB dérivés de l'intestin en déterminant leur profil cytokinique. Les LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7^-$  et Int.  $\beta 7^+$  et les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta 7^-$ /Int.  $\beta 7^+$  ont été isolés par cytométrie en flux et cultivés en présence de CD40L, anti-BCR et de CpG pendant 48h. Puis, les concentrations de cytokines dans les surnageants ont été déterminées par multiplex. Au sein des LB CD27+IgD+, nous avons observé que les concentrations des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , LT- $\alpha$  et IL-6 étaient plus importantes dans les surnageants de cultures des LB CD27+IgD+ exprimant l'Int.  $\beta 7$  comparé à leurs homologues n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$  (**Figure 20**). La concentration de BAFF, une cytokine activatrice des LB, était également plus élevée dans les surnageants de culture des LB CD27+IgD+Int.  $\beta 7^+$  comparé à ceux des cultures de LB CD27+IgD+Int. $\beta 7^-$ . De manière intéressante, la concentration d'IL-10, une cytokine régulatrice, était aussi supérieure dans le surnageant de culture des LB CD27+IgD+ intestinaux comparé à ceux des LB CD27+IgD+ non-intestinaux. De plus, les concentrations de TNF $\alpha$ , LT- $\alpha$ , IL-6, BAFF et IL-10 étaient statistiquement plus élevées dans les surnageants de cultures des LB CD27+IgD+ Int.  $\beta 7^+$  que dans les surnageants de LB CD27+IgD- intestinaux ou non. Cependant, nous avons observé au sein des LB CD27+IgD- que la concentration des cytokines pro-inflammatoires TNF $\alpha$ , LT- $\alpha$  et IL-6, de BAFF et de l'IL-10 était également plus élevée dans le surnageant des cultures des LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7^+$  que dans le surnageant des LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7^-$ . En revanche, nous n'avons pas observé de différence dans la sécrétion de l'IL-2 et nous n'avons pas détecté la présence d'IFN $\gamma$ , d'IL-17A, d'APRIL, d'IL-13, d'IL-4 et d'IL12p70 dans les surnageants de culture (données non montrées).

Nous concluons que les LB CD27+IgD+ et les LB CD27+IgD- dérivés de l'intestin présentent un profil inflammatoire et régulateur avec une capacité de sécrétion de cytokine supérieure à celle de leurs équivalents n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$ . L'environnement dans lequel les LB ont été activés semble donc avoir un impact sur leurs propriétés inflammatoires et leur capacité régulatrice.



**Figure 20 : Les LB CD27+IgD+ et les LB CD27+IgD- dérivés de l'intestin (intégrine β7+) sécrètent des quantités plus importantes de cytokines inflammatoires et régulatrices que leurs homologues n'exprimant pas l'intégrine β7 chez les donneurs sains.**

Concentration de TNF $\alpha$ , LT $\alpha$ , IL-6, BAFF, IL-10 et IL-2 dans les surnageants de culture de LB CD27+IgD- ou de LB CD27+IgD+ exprimant ou non l'intégrine β7 cultivés pendant 48h en présence de CD40L, du CpG et d'anti-BCR. T-Test de Student apparié, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, n=13.

**Les LB CD27+IgD- et CD27+IgD+ exprimant l'intégrine β7+ possèdent un profil transcriptomique différent de leurs homologues n'exprimant pas l'intégrine β7 chez les donneurs sains.**

Afin de mieux caractériser les différences entre les populations de LB dérivés ou non de l'intestin, nous avons réalisé, sur les prélèvements de 5 donneurs sains, une étude transcriptomique comparative de ces populations de LB triées par cytométrie en flux sur puces à ARN couvrant l'expression de plus de 20 000 gènes.

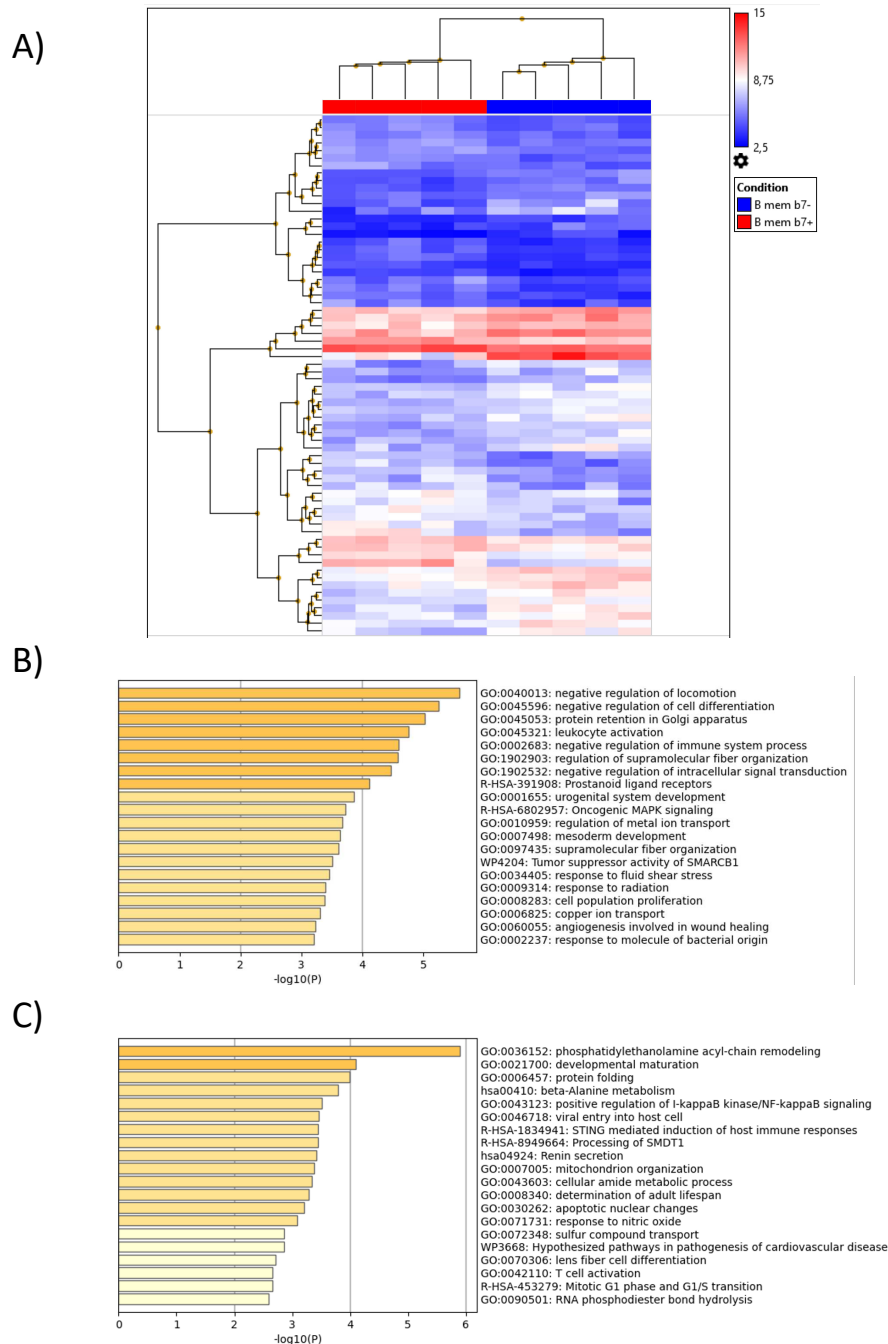
Concernant les LB CD27+IgD-, nous avons observé une expression différentielle de 107 gènes (fold change supérieur ou inférieur à 2, p value < 0,001) entre les LB CD27+IgD- Int. β7- et les LB CD27+IgD- Int. β7+ (**Figure 21A**). Nous avons ensuite déterminé les voies de signalisation dans lesquelles les gènes différentiellement exprimés par les LB CD27+IgD- Int. β7- et Int. β7+ étaient impliqués. Cette analyse a été effectuée à l'aide de la ressource Metascape sur les gènes surexprimés (272 gènes, **Figure 21B**) ou sous-exprimés (303 gènes, **Figure 21C**) par les LB CD27+ IgD- intégrine β7+ (fold change supérieur ou inférieur à 1,3 ;

p value < 0,01). Cette analyse montre une moins forte expression de gènes impliqués dans les voies de signalisation de l'activation des leucocytes et de la prolifération cellulaire dans les LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7+ comparé aux LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7- (**Figure 21B**). Ces données sont cohérentes avec la plus faible prolifération et survie des LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7+ observée en culture par rapport aux LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7- (**Figure 18D**). Par ailleurs, nous avons identifié que les LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7+ exprimaient plus fortement des gènes impliqués dans la voie de signalisation de STING par rapport aux LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7- (**Figure 21C**). STING est une molécule impliquée dans la reconnaissance de l'ADN cytosolique qui régule négativement la signalisation du BCR, ce qui pourrait expliquer la plus faible différenciation des LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7+ en plasmocytes que nous avons observé<sup>308</sup>. Cette augmentation de l'expression de gènes impliqués dans la voie de signalisation de STING pourrait s'expliquer par la présence d'ADN microbien dans l'intestin du fait de la présence du microbiote intestinal.

Concernant le profil transcriptomique des LB CD27+IgD+ dérivés ou non de l'intestin, nous avons observé une différence dans l'expression de 140 gènes (fold change supérieur ou inférieur à 2, p value < 0,001) entre les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7- et les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ (**Figure 22A**). L'analyse par Metascape des gènes surexprimés (342 gènes, **Figure 22B**) ou sous-exprimés (328 gènes, **Figure 22C**) par les LB CD27+IgD+ intégrine  $\beta$ 7+ (fold change supérieur ou inférieur à 1,3 ; p value < 0,01) montre que 66 des gènes sous-exprimés par les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ appartiennent à la voie de signalisation du BCR (**Figure 22B**). Ces données sont en accord avec la plus faible différenciation et prolifération des LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ par rapport aux LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7- que nous avons précédemment décrit (**Figure 18D**). L'expression de gènes, impliqués dans les voies de signalisation des FC $\gamma$ R qui peuvent notamment réguler le niveau d'activation des LB, était également plus faible dans les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+<sup>309</sup>. De même, l'expression des gènes impliqués dans la voie de signalisation des interleukines était diminuée dans les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+, suggérant que ces cellules sont moins sensibles à l'activation médiée par des cytokines. Par contre, les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ exprimaient plus fortement les transcrits de gènes impliqués dans la voie de signalisation de la famille de l'IL-12. La signalisation à l'IL-12 est notamment impliquée dans la production de IFN $\gamma$  par les LB<sup>310</sup>.

L'analyse de l'expression des ARN nous a permis d'identifier que les LB dérivés de l'intestin avaient un profil transcriptomique différent des LB non intestinaux. Cependant, cette étude mérite d'avantage d'investigation pour déterminer quels gènes pourraient expliquer les différences fonctionnelles des LB dérivés de l'intestin.

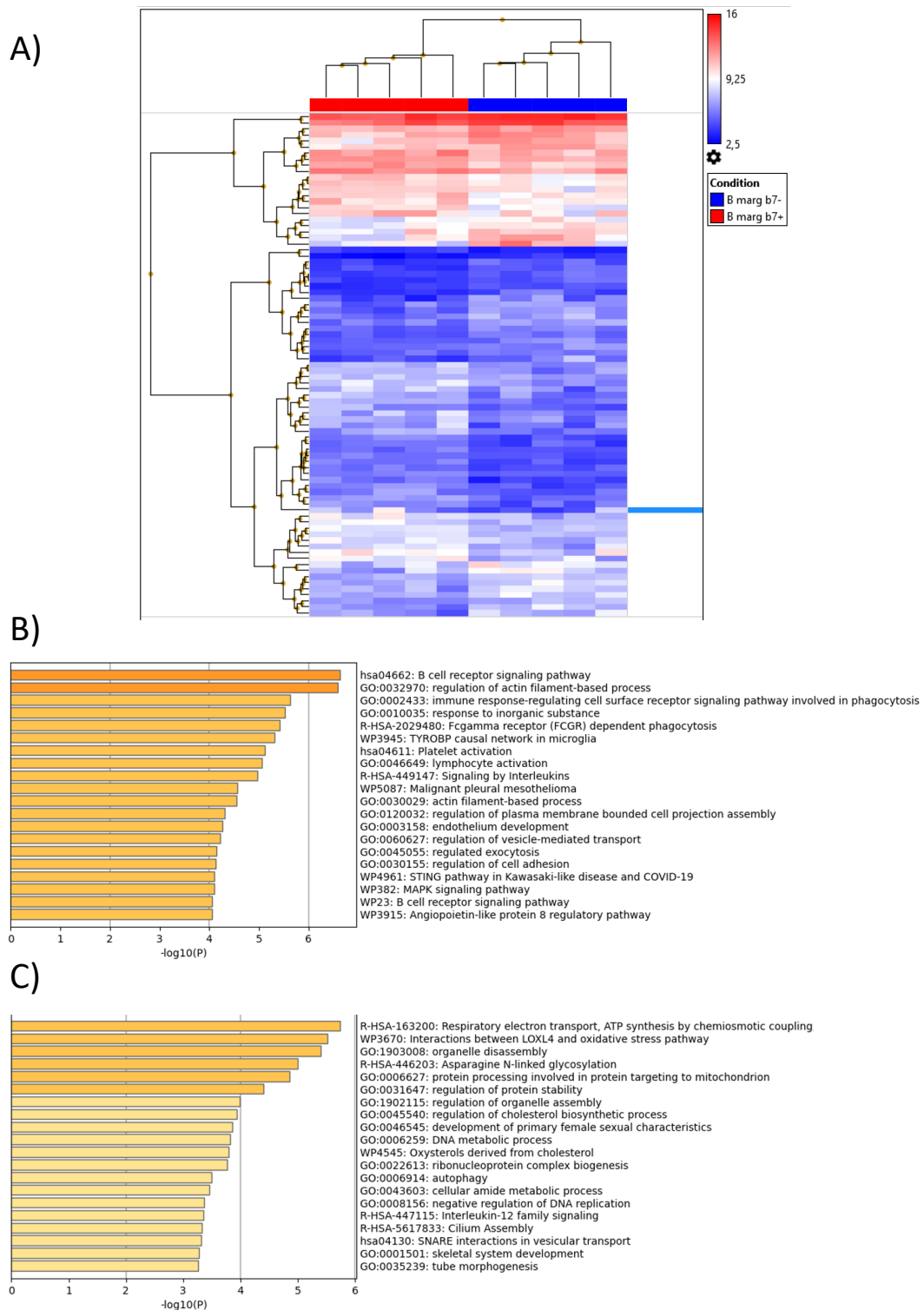




**Figure 21 : Expression différentielle de gènes impliqués dans des voies de signalisation entre les LB CD27+IgD- dérivés ou non de l'intestin chez les donneurs sains.**

A) Les LB CD27+IgD- provenant (Int.  $\beta 7^+$ ) ou non (Int.  $\beta 7^-$ ) de l'intestin ont été isolés par cytométrie en flux et leurs profils transcriptomiques ont été déterminés par Microarray (human Clariom S assays). Les résultats ont été analysés à l'aide du logiciel Transcriptome Analysis Console software d'Affymetrix. Les résultats de l'expression différentielle des gènes entre les deux populations sont représentés sous forme de carte thermique (heatmap) des gènes ayant un facteur de modification d'expression minimal de 2 entre les deux populations cellulaires. Résultats pour 5 donneurs sains, p-value < 0,0005.

B-C) Analyse avec le logiciel Metascape des voies de signalisation pour lesquelles les gènes dont l'expression est diminuée (B) ou augmentée (C) dans les LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7^+$  par rapport aux CD27+IgD- Int.  $\beta 7^-$  sont impliqués. L'axe des abscisses représente le nombre de gènes (log 10) impliqués dans les voies de signalisation indiquées. Le seuil de l'expression différentielle des ARN a été fixé pour cette analyse à 1,3. P-value < 0,01.



**Figure 22 : Expression différentielle de gènes impliqués dans des voies de signalisation entre les LB CD27+IgD+ dérivés ou non de l'intestin chez les donneurs sains.**

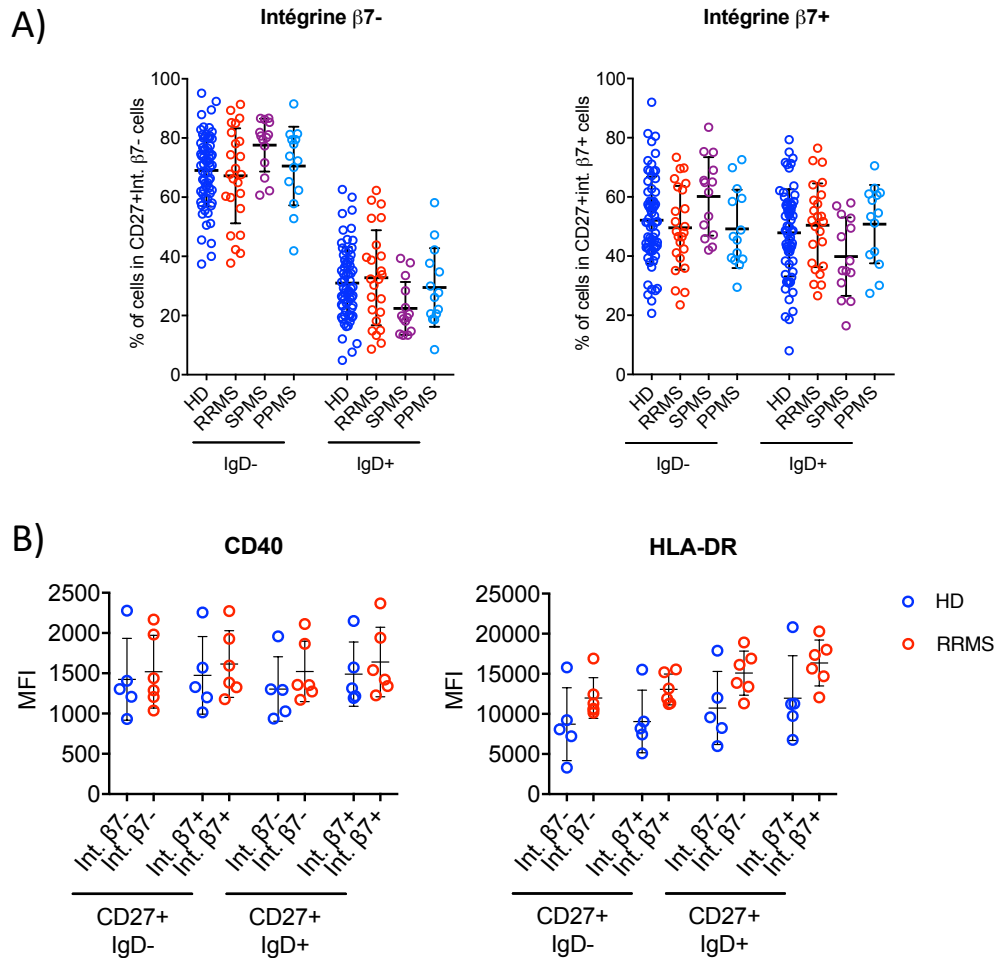
A) Heatmap des ARN différenciellement exprimés (facteur de modification d'expression minimal de 2) par les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ et les LB CD27+IgD+Int.  $\beta$ 7-. Résultats pour 5 donneurs sains, p-value < 0,0005.

B-C) Analyse par Metascape des voies de signalisation impliquant les gènes dont l'expression est diminuée (B) ou augmentée (C) dans les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ par rapport aux CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7-. L'axe des abscisses représente le nombre de gènes (log 10) impliqués dans les voies de signalisation indiquée. Le seuil de l'expression différentielle des ARN est fixé à 1,3. P-value < 0,01.

**Les proportions de LB CD27+IgD+ et LB CD27+IgD- comprises dans le compartiment intégrine  $\beta 7+$  sont similaires chez les patients SEP et les donneurs sains.**

Après avoir caractérisé les LB CD27+IgD- et LB CD27+IgD+ dérivés de l'intestin chez les donneurs sains, nous nous sommes intéressé à leurs caractéristiques chez les patients SEP afin d'évaluer leur potentiel pathogénique dans la SEP. Nous nous sommes tout d'abord demandé si la proportion de LB CD27+IgD- et CD27+IgD+ dans les compartiments intégrine  $\beta 7-$  et/ou intégrine  $\beta 7+$  était altérée chez les patients SEP. Dans le compartiment intégrine  $\beta 7-$  comme dans le compartiment intégrine  $\beta 7+$ , nous avons observé une tendance en faveur d'une plus forte proportion de LB CD27+IgD- et une plus faible proportion de LB CD27+IgD+ en phase SPMS comparativement aux donneurs sains et patients RRMS et SPMS (**Figure 23A**).

Nous nous sommes ensuite intéressé au niveau d'expression des molécules de co-stimulations par les LB CD27+ (IgD- ou IgD+) de patients SEP en phase RRMS. Comme pour les sujets sains, nous n'avons pas détecté d'expression de CD80 et CD86 en l'absence de restimulation in vitro. Le niveau d'expression de CD40 par les LB CD27+IgD- et les LB CD27+IgD+ des patients SEP était similaire à ceux observés chez les donneurs sains (**Figure 23B**). Concernant l'expression de HLA-DR, nous avons observé une tendance à une plus forte expression de HLA-DR par les quatre populations de LB CD27+IgD+ chez les patients SEP en phase RRMS comparé aux donneurs sains. Aucune différence significative de l'expression de CD40 ou HLA-DR n'a été observée entre les LB dérivés ou non de l'intestin chez les patients SEP.



**Figure 23 : La proportion de LB CD27+IgD<sup>+</sup> et de LB CD27+IgD<sup>-</sup> dans le compartiment intégrine  $\beta 7$  est similaire chez les patients SEP et les donneurs sains.**

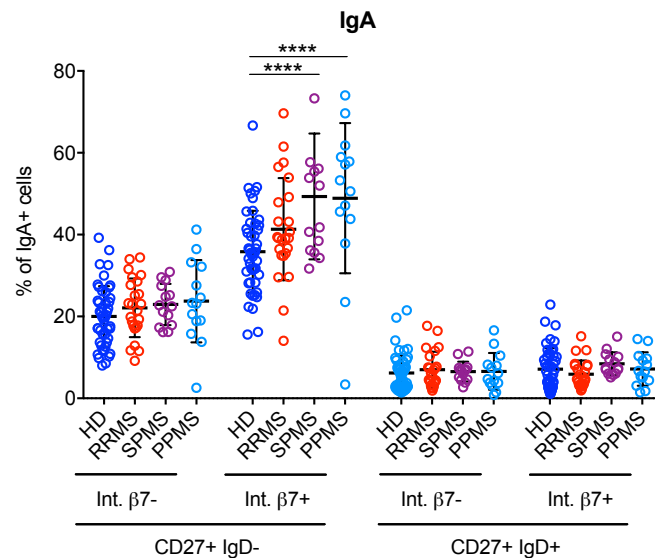
A) Pourcentages de LB CD27+IgD<sup>-</sup> et de LB CD27+IgD<sup>+</sup> dans les LB CD27<sup>+</sup> exprimant (droite) ou non (gauche) l'intégrine  $\beta 7$  chez les donneurs sains (HD n=66) et les patients SEP en phase RRMS (n=24), SPMS (=14) et PPMS (n=14).

B) MFI de l'expression de CD40 (graphique de gauche) et de HLA-DR (graphique de droite) chez les LB CD27+IgD<sup>-</sup> et LB CD27+IgD<sup>+</sup> en fonction de l'expression de l'intégrine  $\beta 7$  chez les donneurs sains (cercles bleus, n=5) et chez les patients SEP en phase RRMS (cercles rouges, n=6).

**La proportion de LB CD27+IgD<sup>-</sup> intégrine  $\beta 7^+$  exprimant des IgA à leur surface est augmentée durant les phases progressives de la SEP.**

Nous nous sommes ensuite intéressé à l'expression des IgG et IgA à la surface des LB CD27+IgD<sup>-</sup> et CD27+IgD<sup>+</sup> chez les patients SEP. Nous n'avons pas observé de différence dans l'expression des IgG de surface par les LB CD27+IgD<sup>-</sup> chez les patients SEP comparativement aux donneurs sains (données non montrées). Par contre, la proportion de cellules exprimant des IgA était augmentée spécifiquement parmi les LB CD27+IgD<sup>-</sup> exprimant l'intégrine  $\beta 7$  chez

les patients en phase SPMS et PPMS comparativement aux donneurs sains suggérant une dérégulation des propriétés de ces cellules lors des phases progressives de la SEP (**Figure 24**).



**Figure 24 : Une plus forte proportion de LB CD27+IgD- dérivés de l'intestin exprime des IgA à leurs surfaces chez les patients avec une SEP progressive par rapport aux donneurs sains.**

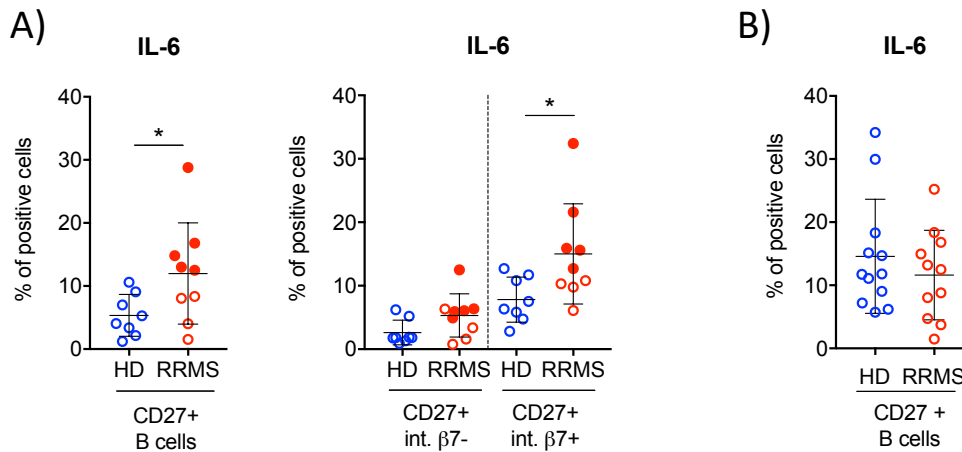
Pourcentages de LB CD27+IgD- et CD27+IgD+ dérivés ou non de l'intestin exprimant à leur surface des IgA chez les donneurs sains (n=47) et chez les patients SEP en phase RRMS (n=24), SPMS (=14), PPMS (n=14). One-way ANOVA (Test de Tukey), \*\*\*\* p<0,0001.

**L'augmentation du pourcentage de LB exprimant l'IL-6 décrite en phase RRMS est particulièrement marquée dans les LB CD27+ exprimant l'intégrine β7.**

Le profil cytokinique des LB CD27+ dérivés ou non de l'intestin des patients SEP a été étudié par cytométrie en flux après une stimulation PMA/ionomycine pendant 5 heures des PBMC de patients en phase RR ou de donneurs sains. Dans une première série d'expérience nous nous sommes intéressé à l'expression de cytokines par la totalité des LB CD27+ sans prendre en compte leur niveau d'expression d'IgD. Dans ces conditions, aucune différence de niveau d'expression d'IL-10, de TNFα, de LT-α, d'IFNγ et de GM-CSF n'a pu être mise en évidence pour les LB CD27+ dérivés ou non de l'intestin entre les patients SEP et les contrôles (données non montrées). En revanche, un pourcentage plus élevé de LB CD27+ exprimant l'IL-6 chez les patients SEP comparé aux sujets sains a été observé (**Figure 25A**). Nous nous sommes donc demandé si cette expression plus importante d'IL-6 concernait les LB CD27+ intégrine β7- et/ou les LB CD27+ intégrine β7+. De façon intéressante, les données obtenues ont montré de manière significative une plus grande proportion de LB CD27+ Int. β7+ exprimant

l'IL-6 chez les patients en phase RRMS comparativement aux donneurs sains, alors qu'une proportion similaire de LB CD27+ Int.  $\beta$ 7- exprimait l'IL-6 chez les patients SEP en phase RRMS et les donneurs sains (**Figure 25A**). De plus les patients pour lesquels une expression plus importante d'IL-6 était observée dans les LB CD27+ totaux (identifiés en rond rouge plein) présentaient une augmentation marquée de l'expression d'IL-6 uniquement dans le compartiment intégrine  $\beta$ 7+. Ces données suggèrent que les LB CD27+ dérivés de l'intestin sont largement responsables de l'expression élevée d'IL-6 observée en phase RRMS au niveau des LB totaux.

Pour déterminer si cette différence importante d'expression d'IL-6 observée dans les LB CD27+ intégrine  $\beta$ 7+ provenait des LB CD27+IgD+ et/ou des LB CD27+IgD-, nous avons réalisé une deuxième série d'expérience en intégrant l'anticorps anti-IgD dans le panel de cytométrie. Cependant, aucune différence de niveau d'expression de l'IL-6 n'a pu être observée pour les LB CD27+ totaux entre les patients RRMS et les contrôles sains dans cette deuxième cohorte (**Figure 25B**). Nous n'avons donc pas pu déterminer si la différence dans la production d'IL-6 observée dans les LB CD27+ Int.  $\beta$ 7+ provenait des LB CD27+IgD+ et/ou CD27+IgD- dérivés de l'intestin (données non montrées). Il est à noter que dans la première série d'expérience seule une fraction des patients SEP étudiés possédait une expression d'IL-6 par les LB CD27+ plus importante que celle des donneurs sains. La différence de niveau d'expression d'IL-6 au sein des LB de patients SEP dans la première cohorte et l'absence d'expression élevée d'IL-6 par les LB des patients de la seconde cohorte suggère que l'augmentation du profil inflammatoire des LB dans la SEP RR est influencée par l'activité récente de la maladie ainsi que potentiellement par les traitements de fond reçus par les patients.



**Figure 25 : L'augmentation du pourcentage de LB exprimant l'IL-6 décrite en phase RRMS est particulièrement marquée dans les LB CD27+ exprimant l'intégrine  $\beta 7$ .**

A) Pourcentages de LB CD27+ totaux (gauche) ou dérivés ou non de l'intestin (droite) exprimant l'IL-6 après stimulation PMA/ionomycine pendant 5h des PBMC de patients en phase RRMS (n=9) et de donneurs sains (n=8). T-Test de Student, \* p<0,05. Les ronds pleins représentent les patients ayant un pourcentage de LB CD27+ totaux exprimant l'IL-6 élevé.

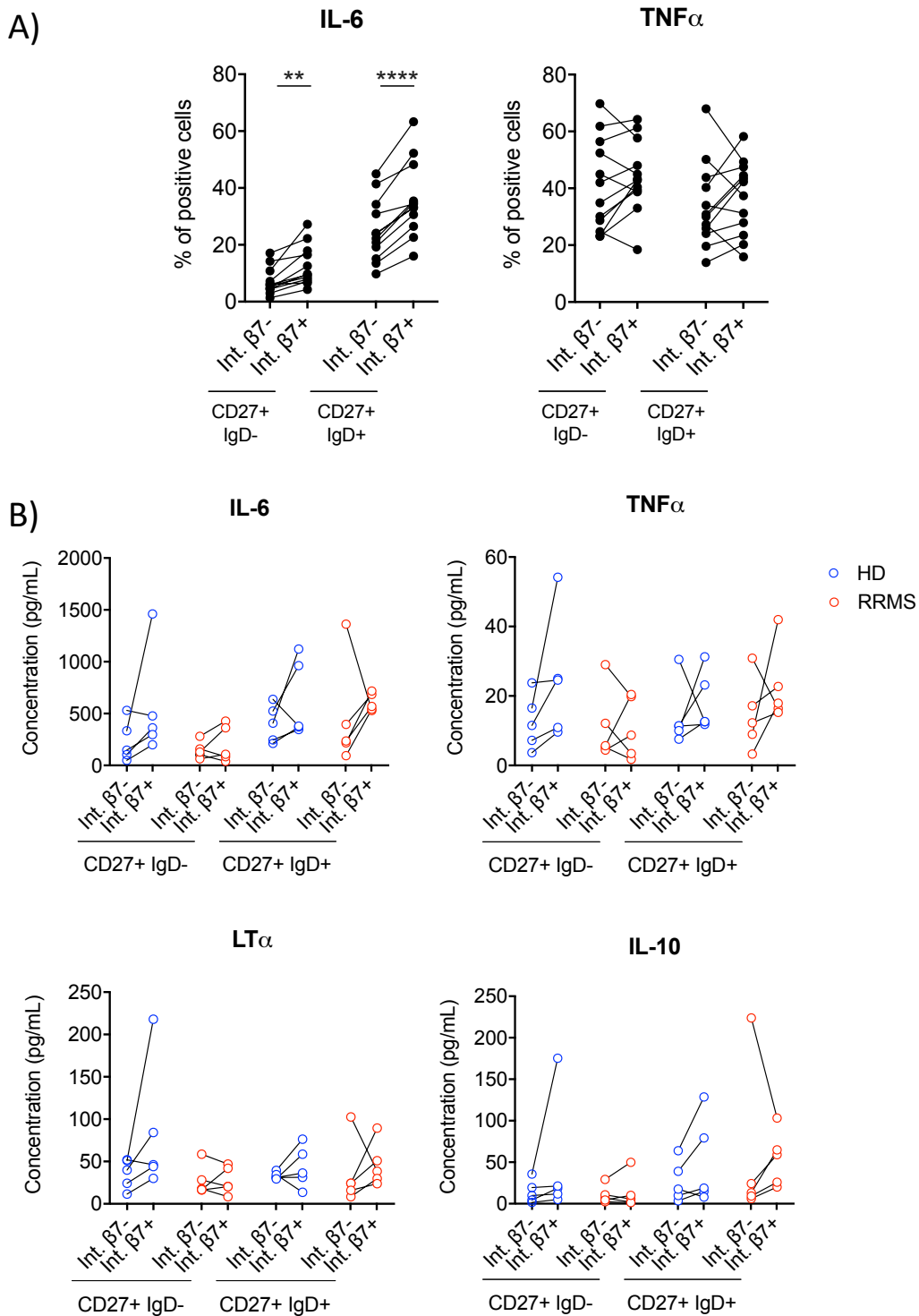
B) Pourcentages de LB CD27+ totaux exprimant l'IL-6 : expérience réalisée comme en A) sur une deuxième série de patients RRMS (n=11) et donneurs sains (n=12).

Nous avons constaté lors de nos expériences sur les donneurs sains que les différences de profils cytokiniques des LB étaient mieux mises en évidence après stimulation anti-BCR, CD40L, CpG et dosage des cytokines dans les surnageants de cultures qu'après une stimulation par la PMA/ionomycine et analyse par cytométrie en flux. En effet, chez des sujets sains une stimulation PMA/ionomycine des PBMC permet d'observer une différence dans la production d'IL-6 entre les LB CD27+ (IgD+ ou IgD-) exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  mais ne permet pas d'observer une différence dans la production de  $TNF\alpha$  entre les différentes populations de LB CD27+ (**Figure 26A**) contrairement à ce que nous avons observé après stimulation des différents sous type de LB CD27 avec de l'anti-BCR, du CD40L soluble et du CpG (**Figure 20**). La stimulation des PBMC par la PMA/ionomycine ne nous a pas permis de mettre en évidence un niveau d'expression d'IL-10, de  $TNF\alpha$ , de LT- $\alpha$  par les LB différent entre patients SEP et donneurs sains. Cependant, ces cytokines ont été décrites comme plus fortement sécrétées par les LB totaux de patients RRMS que de donneurs sains<sup>206,208</sup>. Nous nous sommes alors demandé si une différence de concentration de ces cytokines pouvait être observée entre les patients RRMS et les donneurs sains dans les surnageants de sous populations de LB stimulées par de l'anti-BCR, du CD40L soluble et du CpG.

Au vu du faible nombre de cellules à notre disposition pour les patients, la purification et la stimulation des 4 différentes populations de LB CD27+ par anti-BCR, du CD40L soluble

et du CpG n'a pu être réalisée que sur  $5 \times 10^3$  cellules par puits de culture (dans la **Figure 20**, la stimulation des sous-populations de LB de donneurs sains avait été réalisée avec  $5 \times 10^4$  cellules par puits). Dans ces conditions de culture, des niveaux similaires d'IL-10, de LT- $\alpha$ , de BAFF, d'IL-2, de TFN $\alpha$  et d'IL-6 ont été observés entre les donneurs sains et les patients SEP en phase RRMS pour les 4 différentes populations de LB CD27 (données non montrées et **Figure 26B**).





**Figure 26 : Le profil de sécrétion cytokinique des LB CD27+IgD<sup>+</sup> exprimant l'intégrine  $\beta$ 7 ne semble pas être altéré chez les patients SEP en phase RRMS.**

A) Pourcentages de LB CD27+IgD<sup>-</sup> et LB CD27+IgD<sup>+</sup> dérivés ou non de l'intestin exprimant l'IL-6 ou le TNF $\alpha$  chez des donneurs sains après stimulation des PBMC pendant 5h avec de la PMA/ionomycine. T-Test de Student, \*\* p<0,01, \*\*\* p<0,001, n=12.

B) Concentration d'IL-6, de TNF $\alpha$ , de LT $\alpha$  et d'IL-10 (pg/mL) dans les surnageants de culture de 5000 LB CD27+ IgD<sup>-</sup> ou CD27+IgD<sup>+</sup> exprimant ou non l'intégrine  $\beta$ 7 isolés de patients RRMS (n=5) ou de donneurs sains (n=5) et cultivés pendant 48h en présence de CD40L, du CpG et de l'anti-BCR.

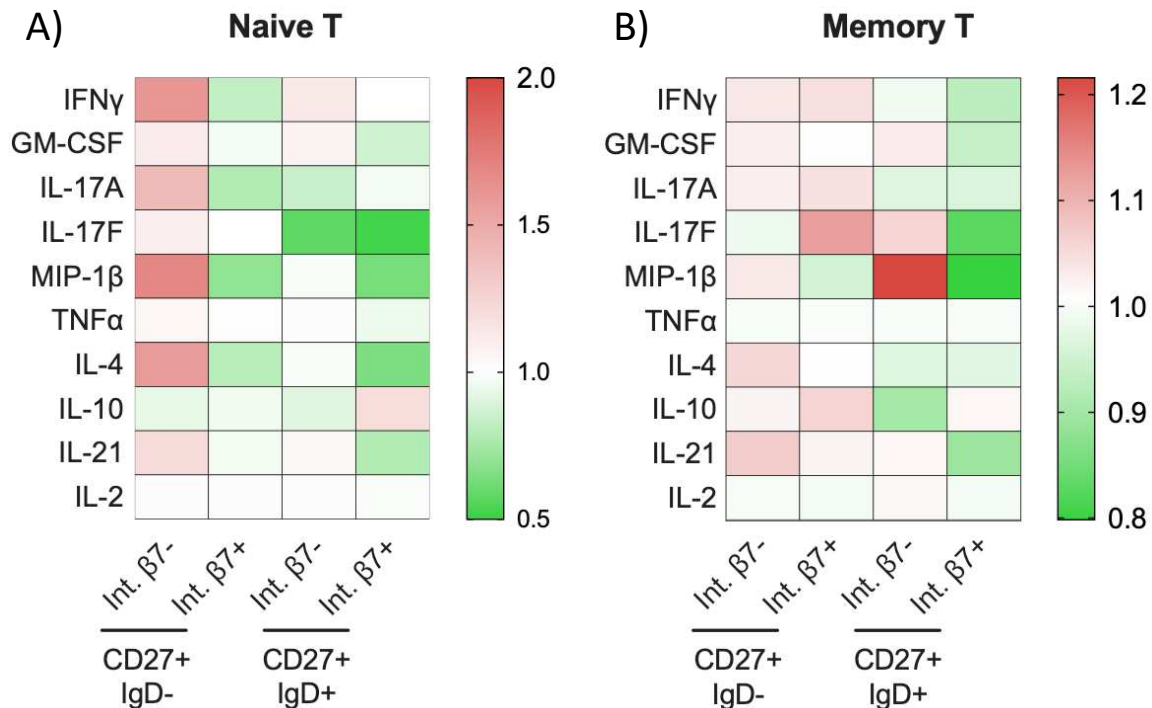
## Les différentes populations de LB CD27+ dérivés de l'intestin induisent une plus faible expression de cytokines inflammatoires par les LT CD4.

Nous avons observé chez les donneurs sains un profil plus inflammatoire des LB CD27+IgD+ et CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7+ par rapport à leurs homologues n'exprimant pas l'intégrine  $\beta$ 7. Nous nous sommes donc demandé si de par leur différence de profil cytokinique les populations de LB CD27+ intestinaux et non intestinaux impactaient différemment la différenciation et la polarisation des LT CD4 naïfs et mémoires. Nous avons donc isolé chaque population de LB (CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7- ; CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7+ ; CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7- ; CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+) et les avons mises en co-culture avec des LT CD4 naïfs (CD4+, CD45RA+) ou mémoires (CD4+, CD45RA-) également isolés par cytométrie en flux. Chaque population de LB a été préalablement activée sur la nuit par de l'anti-BCR, du CD40L soluble et du CpG. En parallèle, les LT CD4 naïfs et mémoires ont également été pré-activés sur la nuit avec des billes anti-CD3/CD28. Après 4 jours de co-cultures, les cellules ont été récoltées puis stimulées avec de la PMA/ionomycine pendant 5h afin d'analyser le profil d'expression cytokinique des LT CD4.

Concernant les cultures avec les LT CD4 naïfs, nous avons observé que les LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7+ induisaient un profil moins inflammatoire des LT CD4 naïfs avec une expression moins importante de d'IFN $\gamma$ , IL-17A et Mip-1 $\beta$  par rapport aux LB CD27+IgD- n'exprimant pas l'intégrine  $\beta$ 7 (**Figure 27A**). L'expression d'IL-4 par les LT CD4 naïfs était également plus faible lorsqu'ils étaient cultivés avec les LB CD27+IgD- exprimant l'intégrine  $\beta$ 7+ que avec LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7-. En ce qui concerne les LB CD27+IgD+, nous avons observé une expression plus faible d'IFN $\gamma$ , GM-CSF, MIP-1 $\beta$  et IL-4 par les LT CD4 naïfs lorsqu'ils étaient stimulés par les LB CD27+IgD+ dérivés de l'intestin. En revanche, une plus forte proportion de LT CD4 naïfs exprimait l'IL-10 et l'IL-17A lorsqu'ils étaient mis en culture avec les LB CD27+IgD+ exprimant l'intégrine  $\beta$ 7.

Les différences de polarisation des LT CD4 mémoires que nous avons observées en présence des différentes populations de LB étaient moins prononcées que dans le cas des LT CD4 naïfs notamment entre les LB CD27+IgD- exprimant ou non l'intégrine  $\beta$ 7 (**Figure 27B**). Concernant la polarisation des LT CD4 mémoires par les LB CD27+IgD+, la MIP-1 $\beta$  et l'IL-17F étaient exprimées par une plus faible proportion de LT CD4 mémoires lorsque ceux-ci étaient stimulés par des LB CD27+IgD+ dérivés de l'intestin comparativement à la stimulation par des LB CD27+IgD+ intégrine  $\beta$ 7-.

L'ensemble de ces données indique que, dans ces conditions de culture, les LB CD27+IgD+ et CD27+IgD- activés dans l'intestin induisent un profil moins inflammatoire des LT CD4 que leurs homologues n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$  pour limiter l'inflammation.



**Figure 27 : Les LB CD27+ dérivés ou non de l'intestin polarisent différemment les LT CD4 naïfs et mémoires chez les donneurs sains.**

Les LT CD4 naïfs (A) et mémoires (B) de donneurs sains préalablement activés sur la nuit avec des billes anti-CD3 et anti-CD28 sont mis en culture avec les LB CD27+IgD- ou CD27+IgD+ exprimant ou non l'intégrine  $\beta 7$  de donneurs sains préalablement activés sur la nuit avec du CD40L, du CpG et de l'anti-BCR (25 000 LT CD4 et 25 000 LB). Après 5 jours de culture, les cellules sont restimulées avec de la PMA/ionomycine et le profil cytokinique des LT CD4 ayant proliférés ( $FSC^{high}SSC^{high} CD4+CD19^-$ ) est déterminé par cytométrie en flux. Les résultats sont représentés sous forme de carte thermique (heatmap) indiquant l'expression différentielle des cytokines par les LT CD4 en fonction des populations de LB, n=3. L'expression différentielle a été calculée en effectuant le ratio du pourcentage de cellules exprimant la cytokine d'intérêt dans la condition étudiée sur la moyenne d'expression de cette cytokine dans les 4 différentes conditions de culture. Puis nous avons réalisé une moyenne des ratios obtenus chez les 3 donneurs pour chaque condition de culture et cytokine étudiée.

Patients	Gender	Age	Clinical phase	EDSS	Treatment	Age at onset
MS03023*	M	50	CIS	0	None	ND
MS69	F	45	RRMS	1	Dimethyl Fumarate	38
MS79	M	30	RRMS	1	Dimethyl Fumarate	23
MS120*	M	42	RRMS	1	Glatiramer Acetate	27
MS104	F	45	RRMS	1,5	Glatiramer Acetate	35
MS102*	F	19	RRMS	1	Glatiramer Acetate	17
MS211*	F	24	RRMS	0	Glatiramer Acetate	20
MS94	F	29	RRMS	1	Interferon $\beta$	27
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
MS99*	M	55	RRMS	3,5	Interferon $\beta$	48
MS106	M	47	RRMS	2,5	Interferon $\beta$	27
MS124*	M	59	RRMS	4	Interferon $\beta$	17
MS83	M	58	RRMS	4	Interferon $\beta$	17
MS86*	M	47	RRMS	2	Interferon $\beta$	37
MS172*	F	28	RRMS	0	Interferon $\beta$	24
MS80*	F	40	RRMS	3	Methylprednisolone	29
MS175*	F	62	RRMS	3,5	None	41
MS61	F	31	RRMS	1,5	None	30
MS88	F	30	RRMS	0	None	30
MS96	F	26	RRMS	1	None	25
MS125	F	33	RRMS	1	None	33
MS93	F	45	RRMS	6	None	19
MS105	F	37	RRMS	2	None	25
MS49	M	26	RRMS	3,5	None	12
MS122	F	35	RRMS	1,5	None	34
MS01014*	F	25	RRMS	ND	None	ND
MS01015*	M	29	RRMS	ND	None	ND
MS01013*	F	33	RRMS	ND	None	ND
MS68*	F	53	RRMS	1	None	44
MS180*	F	54	RRMS	3,5	None	20
MS187*	F	28	RRMS	1,5	None	25
MS68	F	53	RRMS	1	Teriflunomide	44
MS71	F	56	RRMS	1,5	Teriflunomide	52
MS98*	M	27	RRMS	1,5	Teriflunomide	23
MS98	M	27	RRMS	1,5	Teriflunomide	23
MS48	F	75	SPMS	6,5	Biotine	54
MS47	F	38	SPMS	6	Cyclophosphamide	22
MS65	F	38	SPMS	6	Cyclophosphamide	20
MS85	F	47	SPMS	2,5	Cyclophosphamide	43
MS78	F	48	SPMS	3,5	Methotrexate	33
MS111	M	53	SPMS	7,5	Methotrexate	23
MS40	M	59	SPMS	3	Methotrexate + Methylprednisolone	36
MS18	M	50	SPMS	6,5	Methotrexate + Methylprednisolone	17
MS70	M	59	SPMS	6	Methotrexate + Methylprednisolone	40
MS67	F	76	SPMS	ND	Methylprednisolone	31
MS81	F	54	SPMS	6	Methylprednisolone	23
MS116	F	65	SPMS	4	Methylprednisolone	56
MS17	M	49	SPMS	4	Methylprednisolone + Biotine	27
MS108	M	67	SPMS	ND	None	29
MS115	M	73	PPMS	ND	Biotine	60
MS52	M	69	PPMS	ND	Cyclophosphamide	63
MS75	M	54	PPMS	4	Methotrexate	46
MS89	F	61	PPMS	6	Methotrexate	38
MS100	M	59	PPMS	3,5	Methotrexate	50
MS113	M	59	PPMS	4	Methotrexate	55
MS34	M	43	PPMS	ND	Methylprednisolone	32
MS95	F	55	PPMS	4	Methylprednisolone	38
MS97	F	55	PPMS	6	Methylprednisolone	42
MS114	M	68	PPMS	ND	Methylprednisolone	68
MS76	F	65	PPMS	7,5	Methylprednisolone	43
MS92	M	62	PPMS	5,5	Methylprednisolone + Cyclophosphamide	56
MS46	M	50	PPMS	6,5	Methylprednisolone + Mycophenolate Mofetil	45
MS82	M	52	PPMS	7	Methylprednisolone + Mycophenolate Mofetil	21

**Tableau 1 : Données cliniques des patients SEP (ND, non déterminé ; \* patients utilisés pour l'étude du profil cytokinique des LB).**

## Projet 2 : Le profil Th1/Th17 induit chez les patients SEP sous Natalizumab est restreint aux LT CD4 mémoires exprimant l'intégrine $\beta 7$ .

La présence de lymphocytes dans le SNC de patients SEP a conduit à la mise en place de thérapies bloquant la migration de cellules immunitaires à travers la BHE. Dans ce contexte, le Natalizumab, un anticorps monoclonal anti-intégrine  $\alpha 4$ , est utilisé comme traitement de fond de seconde ligne pour les patients SEP en phase RRMS. Le Natalizumab se fixe à l'intégrine  $\alpha 4$  empêchant la liaison de l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ , exprimée notamment par les LT CD4, à son ligand VCAM-1, exprimé par les cellules endothéliales de la BHE, inhibant ainsi la migration des lymphocytes dans le SNC. Le Natalizumab réduit efficacement l'apparition de poussées mais le traitement est souvent interrompu pour éviter la réactivation du polyomavirus John Cunningham dans le SNC des patients. Cependant, l'arrêt du traitement est associé à un rebond de la maladie (défini par un taux de poussées plus élevé qu'avant la prise du Natalizumab) chez environ 20% des patients SEP. Les mécanismes impliqués dans ces rechutes ne sont pas connus. Il a été observé chez les patients SEP sous Natalizumab, une augmentation de la fréquence de Th1/Th17 exprimant des cytokines inflammatoires dans la circulation sanguine. L'intégrine  $\alpha 4$  peut s'associer à l'intégrine  $\beta 1$  pour former l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$ , mais également à l'intégrine  $\beta 7$  pour former la molécule d'adressage intestinal, l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ . Les LT CD4 exprimant des marqueurs d'adressage intestinaux, incluant l'intégrine  $\beta 7$ , ont été observés dans le LCR de patients SEP, indiquant que les LT CD4 dérivés de l'intestin peuvent franchir la BHE, et donc jouer un rôle dans la pathogenèse de la SEP.

Dans ce contexte, nous nous sommes intéressés aux propriétés des LT CD4 intestinaux chez les patients traités par le Natalizumab. Nous avons déterminé les profils phénotypiques et cytokiniques des LT CD4 exprimant l'intégrine  $\beta 7$  chez les patients en phase RRMS traités ou non par le Natalizumab ainsi que chez les donneurs sains. Nous montrons une plus forte proportion de Th1/Th17 parmi les LT CD4 exprimant l'intégrine  $\beta 7$  chez les patients traités par le Natalizumab par rapport aux patients RRMS ne recevant pas de Natalizumab et aux donneurs sains. Nous montrons également, chez ces patients traités par Natalizumab, une augmentation de la proportion de LT CD4 co-exprimant les cytokines inflammatoires IL-17A et GM-CSF,

ainsi que IL-17A et IFN $\gamma$  parmi les LT CD4 exprimant l'intégrine  $\beta$ 7. Nous n'avons pas observé ces modifications parmi les LT CD4 non intestinaux chez les patients RRMS sous Natalizumab.

Les résultats obtenues au cours de notre étude suggèrent donc que les LT CD4 intestinaux présents dans la circulation sanguine sous Natalizumab ont un profil pathogénique. Ainsi ils pourraient être impliqués dans le rebond de la maladie observé chez 20% des patients à l'arrêt du Natalizumab.

# The Th1/Th17 profile induced upon Natalizumab in multiple sclerosis is limited to integrin $\beta 7$ + cells

Mélanie Nguyen Ky<sup>1,†</sup>, Adrien Duran<sup>1,†</sup>, Agnès Bru<sup>1</sup>, Anaëlle Stum<sup>1</sup>, Mathilde Deloïre<sup>2</sup>, Bruno Brochet<sup>2</sup>, Aurélie Ruet<sup>2</sup>, Nathalie Schmitt<sup>1</sup>

<sup>†</sup>These authors contributed equally to this work.

## Abstract

Natalizumab is a monoclonal humanized antibody targeting integrin  $\alpha 4$ . Natalizumab efficiently decreases the transmigration of inflammatory CD4 T cells across the blood-brain barrier in relapsing-remitting multiple sclerosis by preventing the binding of integrin  $\alpha 4\beta 1$  expressed by lymphocytes to its ligand VCAM-1 expressed on brain vascular endothelial cells. While natalizumab treatment reduces the clinical relapse rate, its discontinuation following reactivation of the John Cunningham polyomavirus has been associated to a rebound of the disease in 20% of patients. The mechanisms of this rebound are not elucidated but natalizumab treatment has been shown to increase the frequencies of circulating CD4 T cells expressing proinflammatory cytokines as well as the proportion of circulating Th1/Th17 cells (Th1-like Th17 cells). Whether these modifications are restricted to CD4 T cells expressing integrin  $\alpha 4\beta 1$  at high levels is not known. Indeed, beside integrin  $\beta 1$ , integrin  $\alpha 4$  also associates in heterodimer with integrin  $\beta 7$  to form the gut-homing receptor integrin  $\alpha 4\beta 7$ . While integrin  $\beta 7$ + memory CD4 T cells express integrin  $\beta 1$  at low levels, studies in mouse models of autoimmune diseases including multiple sclerosis have shown that intestinal lymphocytes can migrate to the target organs of autoimmune diseases where they participate to the pathogenesis. Accordingly, lymphocytes expressing gut-homing receptors are detected in large proportions in the CSF and CNS of multiple sclerosis patients.

In this study, we investigated whether the phenotypes and cytokine expression profiles of blood integrin  $\beta 7$ + memory CD4 T cells differ in healthy donors and patients treated or not with natalizumab.

We found that the proportions of proinflammatory Th1/Th17 cells as well as of IL-17A+IFN $\gamma$ + and IL-17A+GM-CSF+ cells were higher in memory CD4 T cells expressing integrin  $\beta 7$  in

patients receiving natalizumab. In contrast, no changes in the phenotype or cytokine expression profile could be detected in integrin  $\beta$ 7-negative memory CD4 T cells. We further showed that integrin  $\beta$ 7+ Th1/Th17 memory CD4 T migrated as efficiently as integrin  $\beta$ 7- Th1/ Th17 across a monolayer of brain microvascular endothelial cells.

Our study therefore shows that circulating integrin  $\beta$ 7 positive memory CD4 T cells of multiple sclerosis patients under natalizumab are specifically enriched in proinflammatory cells supporting the hypothesis that integrin  $\beta$ 7 positive memory CD4 T cells could play a pathogenic role in the disease rebound observed at natalizumab discontinuation in 20% of relapsing-remitting multiple sclerosis patients.

#### **Author affiliations:**

1 Immunoconcept, CNRS UMR 5164, Bordeaux University, Bordeaux 33076, France

2 Service de Neurologie, CRC SEP, Centre Hospitalier Universitaire (CHU) de Bordeaux, Bordeaux, France.

Correspondence to: Nathalie Schmitt

CNRS UMR 5164, Bordeaux University, CNRS UMR 5164, Université de Bordeaux, Bât 1B, RDC, 146 rue Léo Saignat, 33076 Bordeaux, France.

nathalie.schmitt@inserm.fr

**Running title:** Th1/ Th17 cells under natalizumab

**Keywords:** multiple sclerosis; CD4 T cells; integrin  $\beta$ 7; Th1/ Th17; natalizumab

**Abbreviations:** EAE = experimental autoimmune encephalomyelitis; EDSS = Expanded Disability Status Scale; RRMS = relapsing-remitting multiple sclerosis; NTZ = Natalizumab; PBMCs = peripheral blood mononuclear cells; PMA = phorbol 12-myristate 13-acetate; TFh = T Follicular helper



## Introduction

Multiple Sclerosis is a chronic, inflammatory and neurodegenerative disease which results from the autoimmune destruction of myelin and associated collateral tissue damages within the CNS.<sup>1</sup> Studies in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) animal models as well as studies on multiple sclerosis 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/Th17 (also known as Th1-like Th17<sup>3</sup>) cells have been shown to be pathogenic in EAE and multiple sclerosis. These subsets, especially Th1/Th17 cells infiltrate the CNS of multiple sclerosis patients<sup>2,4</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 (NTZ) is a monoclonal humanized antibody directed against the  $\alpha 4$  subunit of the integrin  $\alpha 4\beta 1$  (VLA-4) preventing the binding of integrin  $\alpha 4\beta 1$  expressed by lymphocytes to its ligand VCAM-1 expressed on the brain vascular endothelium. Studies have shown that natalizumab treatment reduces the expression on lymphocytes of both subunits of VLA-4<sup>5</sup> but also the expression of integrin  $\alpha L$  (CD11a),<sup>6</sup> a subunit of LFA1 which binds to ICAM and together with VLA-4 mediates the transmigration of leucocytes through the blood-brain barrier. Natalizumab efficiently reduces the transmigration of inflammatory immune cells across the blood-brain barrier and reduces clinical relapse rate in RRMS. However, natalizumab treatment is associated to the risk of developing progressive multifocal leukoencephalopathy due to the reactivation in the CNS of the John Cunningham polyomavirus,<sup>7</sup> and the treatment is therefore frequently interrupted. Natalizumab discontinuation has been associated to a rebound of the disease which is defined as a higher relapse rate after cessation of natalizumab than before natalizumab, in 20% of RRMS patients.<sup>8,9</sup> The mechanisms involved in this rebound of the disease 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/Th17 cells in the blood of RRMS patients.<sup>3,10</sup> However, whether these alterations are specifically restricted to memory CD4 T cells expressing high levels of integrin  $\alpha 4\beta 1$  is not known.

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<sup>11</sup>. Integrin  $\alpha 4\beta 7$  as well as CCR9, another gut-homing

receptor, are induced on 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 where their ligand MAdCAM-1 and CCL25 are highly expressed.<sup>12,13</sup> While integrin  $\beta 7^+$  memory CD4 T cells have been described as expressing integrin  $\beta 1$  at low levels,<sup>14,15</sup> recent studies have underscored a key role of gut-derived lymphocytes in the pathogenesis of MS. Indeed, 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.<sup>16-19</sup> Accordingly, CD4 T cells expressing integrin  $\beta 7$  and/or CCR9 are detected in the CSF of multiple sclerosis patients and patients with non-inflammatory neurological diseases<sup>20,21</sup> while the gene encoding integrin  $\beta 7$  is found expressed on the majority of IgA+ B cells in the brain of multiple sclerosis patients.<sup>22</sup>

In the current study, we investigated whether the properties of circulating 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 contain increased proportions of Th1/Th17 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 multiple sclerosis 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 ethical 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 coats) was obtained from the établissement français du sang. Peripheral blood mononuclear cells (PBMCs) were isolated by density gradient centrifugation (Ficoll-Paque, Cytivia), then used directly for experiments or frozen and stored in liquid nitrogen for subsequent use.

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

Freshly isolated PBMCs from multiple sclerosis 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. Antibodies directed against CD4 (OKT4), int.β7 (FIB504), int.β1 (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 multiple sclerosis 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, 1mM sodium pyruvate, nonessential amino acids, 25mM HEPES (all from Life Technologies) and 50μM 2-mercaptoethanol (Sigma), in the presence of GolgiStop (BD Biosciences) and Brefeldin (eBioscience) for the last 3.5 hours. After stimulation, PBMCs were surface stained with antibodies directed against CD3 (UCHT1), CD8 (SFCI21Thy2D3, Beckman Coulter) and int.β7 (FIB504, BD Biosciences) in the presence of Zombie Aqua fixable viability marker. Cells were then fixed and permeabilized and incubated with IFN $\gamma$  (4SB3), TNF $\alpha$  (Maβ11), IL-22 (2G12A41), IL-17A (BL168), IL-10 (JES3-9D7), GM-CSF (BVD2-21C11) and CD45RA

(HI100) mAbs from Biolegend and MIP-1 $\beta$  (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>23</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, ascorbic acid (5 $\mu$ g/ml, Sigma), 1% chemically defined lipid concentrate (Life Technologies), human basic fibroblast growth factor (1ng/ml, Sigma), hydrocortisone (1.4 $\mu$ M, Sigma), HEPES (10mM), penicillin and streptomycin (100U/ml each) in culture flasks coated with Cultrex® Rat Collagen I at 150 $\mu$ g/ml (R&D systems). Preliminary phenotyping of the hCMEC/D3 confirmed that they express ICAM-1 constitutively and V-CAM following stimulation with TNF $\alpha$  (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 3 $\mu$ m (Falcon) coated with Cultrex® Rat Collagen I (150 $\mu$ g/ml). hCMEC/D3 were then cultured for 7 days with renewal of the culture medium every 2 days and, at day 6 of culture, 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<sup>+</sup> T cell isolation kit (Miltenyi Biotec). 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 (G034E3). CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>, CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>, CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup> and CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> cells were purified among CD4<sup>+</sup>CD56<sup>-</sup>CD8<sup>-</sup>CD45RA<sup>-</sup> lymphocytes by sorting with a FACSAria (BD Biosciences). Cell purity was >98%. Isolated CD4 T cell subsets were labeled with CellTrace™ Violet (Life Technologies) and each subset was mixed back separately with autologous unlabeled PBMCs (ratio 1:4). The PBMCs (containing the labeled subsets) were then stimulated with dynabeads coated with CD3 and CD28 mAbs (Dyna). After overnight incubation, the dynabeads were removed and 1x10<sup>6</sup> PBMCs resuspended in 500 $\mu$ l of RPMI supplemented with 5% FCS, L-glutamine (2mM), ascorbic acid (5 $\mu$ g/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 phosphate-buffer saline containing EDTA (0.1M). Cells were then labelled with mAbs specific for CD4, CD45RA, int.β7, int.β1 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.β7- and int.β7+ Th subset were determined by calculating the number of int.β7- int.β1+ or int.β7+ int.β1<sup>low</sup> in CXCR5- CellTrace™ Violet positive cells contained in the top and bottom chambers and establishing the ratio between the number of 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, Paired Student t test or one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test. A value of  $p < 0.05$  was considered significant. \* $<0.5$ , \*\* $<0.1$ , \*\*\* $<0.001$ , \*\*\*\* $<0.0001$ .

## **Data availability**

The data that support the findings of this study are available from the corresponding author, upon reasonable request.

## **Results**

### **Integrin β7+ memory CD4 T cells display a higher pro-inflammatory profile compared to integrin β7- memory CD4 T cells at steady state**

Natalizumab treatment targets integrin α4 which can associate to integrin β1 or integrin β7 on circulating lymphocytes. We observed that the majority ( $62.3 \pm 8.1\%$  , median  $\pm$  SD) of blood

memory CD4 T cells from healthy donors expressed integrin  $\alpha 4$  with integrin  $\beta 7$  being expressed by  $30.2 \pm 6.4\%$  (median  $\pm$  SD) of integrin  $\alpha 4^+$  memory CD4 T cells (Fig.1A and B). Next, we evaluated the expression of integrin  $\beta 1$  on integrin  $\alpha 4^+$  memory CD4 T cells expressing or not integrin  $\beta 7$ . In agreement with previous studies,<sup>14,15,24</sup> we noted that 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 which expressed integrin  $\beta 1$  at high levels (Fig.1C and D). Integrin  $\alpha 4$ -expressing memory CD4 T cells could thus be subdivided into int. $\beta 7^-$  int. $\beta 1^+$  and int. $\beta 7^+$  int. $\beta 1^{\text{low}}$  memory CD4 T cells in healthy donors.

We next asked whether the repartition in Th1, Th2, Th17 and Th1/Th17 (also known as Th1-like Th17<sup>3</sup>) subsets as well as the cytokine expression profile differs between integrin  $\beta 7^-$  and integrin  $\beta 7^+$  memory CD4 T cells in healthy individuals. The differential expression of the chemokine receptors CXCR3 and CCR6 allowed the identification of Th1 (CXCR3+CCR6-), Th2 (CXCR3-CCR6-), Th17 (CXCR3-CCR6+) and Th1/Th17 (CXCR3+CCR6+) subsets in CXCR5- CD45RA- CD4 T cells expressing or not integrin  $\beta 7$  (Fig.1E). We determined that int. $\beta 7^+$  memory CD4 T cells contained a higher percentage of Th1/Th17 cells and a lower percentage of Th17 cells compared to int. $\beta 7^-$  memory CD4 T cells (Fig.1F). Concerning the cytokine expression profile of int. $\beta 7^+$  memory CD4 T cells, a higher proportion of these cells express the proinflammatory cytokines IFN $\gamma$ , MIP-1 $\beta$ , TNF $\alpha$  and IL-22 compared to int. $\beta 7^-$  memory CD4 T cells in healthy donors (Fig.1G). In contrast, int. $\beta 7^+$  memory CD4 T cells were less potent at expressing IL-10 and IL-13 compared to int. $\beta 7^-$  memory CD4 T cells. Concerning the other cytokines studied (Supplementary Fig.1), IL-9 was expressed by a higher proportion of int. $\beta 7^+$  cells while IL-21 expression was lower in int. $\beta 7^+$  cells compared to int. $\beta 7^-$  cells. Altogether these results indicated that int. $\beta 7^+$  memory CD4 T cells display a higher inflammatory profile compared to int. $\beta 7^-$  memory CD4 T cells in the steady state.

## **Natalizumab treatment decreases the expression of brain-homing molecules at the surface of int. $\beta 7^+$ memory CD4 T cells**

Having defined the properties of int. $\beta 7^+$  and int. $\beta 7^-$  memory CD4 T cells in healthy donors, we next examined the impact of natalizumab treatment on integrin  $\beta 7^+$  memory CD4 T cells in RRMS patients. To this end, we compared the properties of integrin  $\beta 7^-$  and integrin  $\beta 7^+$

memory CD4 T cells from healthy donors, RRMS patients either untreated or receiving disease-modifying therapies excluding natalizumab (RRMS NTZ-) and RRMS patients under natalizumab (RRMS NTZ+) (Table 1). 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 patients. We observed that the absolute blood counts of total CD4 T cells, 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 (median fold change of 1.30 and 1.41 for int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells respectively) and healthy donors (median fold change of 2.17 and 1.93 for int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells respectively) (Fig.2A). As expected, the level of expression of integrin α4 was decreased on RRMS NTZ+ compared to RRMS NTZ- patients and healthy donors (Fig.2B). This decrease of expression of integrin α4 was accompanied by a decrease of the intensity of int.β7 expression on int.β7+ memory CD4 T cells (Fig.2B). Importantly, despite this decrease in the intensity of integrin β7 expression under NTZ, integrin β7-expressing and non-expressing memory CD4 T cells still clearly segregated by flow cytometry in RRMS NTZ+ patients in regard to the expression of integrin β7 and accordingly the percentages of int.β7+ memory CD4 T cells did not differ between RRMS patients treated or not with NTZ (Fig.2C). This conserved bimodal expression of integrin β7 in RRMS NTZ+ patients allowed us to compare the impact of natalizumab treatment on int.β7+ and int.β7- memory CD4 T cells. We first asked how the expression of the brain homing molecules was altered under NTZ on int.β7- and int.β7+ memory CD4 T cells. We studied the expression of integrin α4 and integrin β1 (forming in heterodimer VLA-4 which interact with VCAM-1) 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.3A and B). 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) (Fig.3B).

These data indicate that int.β7<sup>+</sup> 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 including of the subunit of LFA-1, the integrin β2.

## **Integrin β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells from RRMS patients treated with natalizumab contain an increased proportion of Th1/Th17 cells**

Since natalizumab treatment has been shown to increase the proportion of circulating Th1/Th17 cells in RRMS patients,<sup>3</sup> we asked what was the impact of natalizumab treatment on the inflammatory properties of int.β7<sup>+</sup> versus int.β7<sup>-</sup> memory CD4 T cells. We proceeded as previously to compare the proportion of Th1, Th2, Th17 and Th1/Th17 in int.β7<sup>-</sup> and int.β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells across healthy donors, RRMS NTZ<sup>-</sup> and NTZ<sup>+</sup> patients. Concerning the Th1, Th2, Th17 and Th1/Th17 subsets contained in the integrin β7<sup>-</sup> compartment, we only observed a limited increase of the proportion of Th1/Th17 cells in RRMS NTZ<sup>+</sup> patients ( $36.8 \pm 5.9\%$ , median  $\pm$  SD) compared to healthy donors ( $30.2 \pm 7.1\%$ , median  $\pm$  SD) but not to RRMS NTZ<sup>-</sup> patients ( $31.0 \pm 7.3\%$ , median  $\pm$  SD) (Fig.5A). This increase of the proportion of Th1/Th17 was also observed in the int.β7<sup>+</sup> compartment but in a more pronounced manner than in the int.β7<sup>-</sup> compartment and both compared to healthy donors and RRMS NTZ<sup>-</sup> patients. Indeed  $50.8 \pm 10.2\%$  (median  $\pm$  SD) of int.β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells from RRMS NTZ<sup>+</sup> patients display a Th1/Th17 phenotype against  $35.5 \pm 6.9\%$  (median  $\pm$  SD) in RRMS NTZ<sup>-</sup> patients and  $40.1 \pm 9.4\%$  (median  $\pm$  SD) in healthy donors. This increase of int.β7<sup>+</sup> Th1/Th17 percentages in RRMS NTZ<sup>+</sup> patients was associated to a decrease of the proportion of int.β7<sup>+</sup> Th1 and Th2 cells in RRMS NTZ<sup>+</sup> compared RRMS NTZ<sup>-</sup> and healthy donors. The proportion of Th17 cells expressing int.β7 was higher in RRMS NTZ<sup>+</sup> as well as in RRMS NTZ<sup>-</sup> patients compared to healthy donors but did not differ between the two groups of patients. As RRMS patients treated with natalizumab have an history of more severe disease (Table 1 and Supplementary Fig.2), we then asked whether the shift toward Th1/Th17 observed in the integrin β7<sup>+</sup> compartment could be related to a higher past activity of the disease rather than to natalizumab treatment by itself. However, as shown in Supplementary Fig.3, we did not observe any significant correlation between the percentages of int.β7<sup>+</sup> Th1/Th17 memory CD4 T cells and the clinical score of the disease (EDSS), the duration of the disease or the number of past relapses in RRMS patients.



We next assessed the impact of natalizumab treatment on the expression of CD226, PD-1 and ICOS on int.β7<sup>-</sup> and int.β7<sup>+</sup> 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 IFN $\gamma$  and IL-17.<sup>25</sup> In addition, genome-wide association studies have defined CD226 allelic variants as a risk factor for multiple sclerosis<sup>26</sup> and blocking CD226 in EAE reduced the disease onset.<sup>27</sup> Here, we observed that the percentage of CD226-expressing cells was specifically increased in int.β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells in RRMS NTZ<sup>+</sup> patients compared to RRMS NTZ<sup>-</sup> patients and healthy donors (Fig.4B). Concerning PD-1 and ICOS, human and mouse studies support a key role of these molecules in the pathogenesis of multiple sclerosis and EAE. PD-1 polymorphism has been associated with disease progression in multiple sclerosis.<sup>28,29</sup> Furthermore, the levels of PD-1 expression have been shown to be reduced on CD4 T cells in acute multiple sclerosis<sup>30,31</sup> and accordingly mice deficient for PD-1 develop more severe EAE.<sup>32</sup> While ICOS is known to promote the expansion of Th1/Th17 in humans,<sup>33</sup> mice deficient for ICOS present an enhanced susceptibility to EAE<sup>34</sup> suggesting a different role of ICOS during the disease. Our study of the level of expression of these two molecules in int.β7<sup>-</sup> and int.β7<sup>+</sup> compartments showed that both PD-1 and ICOS were expressed by a reduced fraction of int.β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells in RRMS NTZ<sup>+</sup> patients compared to healthy donors and RRMS NTZ<sup>-</sup> patients while the expression of these molecules in the int.β7<sup>-</sup> cells was not altered (Fig.4B).

Altogether, these results suggest that integrin β7-expressing memory CD4 T cells present in the circulation of RRMS patients under natalizumab possess an increased inflammatory and pathogenic phenotype.

## **Natalizumab treatment induces an increased co-expression of Th1/Th17 cytokines by integrin β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells**

Natalizumab treatment has been shown to increase the expression of IFN $\gamma$  and IL-17A in CD4 T cells<sup>10</sup> as well as the expression of IFN $\gamma$  and GM-CSF by Th1/Th17 cells<sup>3</sup> in RRMS patients. Since we observed an increase of the proportion of Th1/Th17 cells in int.β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells from RRMS NTZ<sup>+</sup> patients, we next assessed whether this was associated to an increased capacity of these cells to express pro-inflammatory cytokines notably those associated to the Th1/Th17 phenotype and multiple sclerosis pathogenicity (Fig.5A and supplementary Fig.4). Concerning int.β7<sup>-</sup> memory CD4 T cells, we did not observe differences in the expression of

GM-CSF, IL-17A and F, IL-22, IFN $\gamma$  or IL-10 between RRMS NTZ+ and RRMS NTZ- patients or healthy donors (Fig.5A, 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 compared to RRMS NTZ- patients and healthy donors (Fig.5A, bottom row). Concerning IFN $\gamma$  its expression by int. $\beta$ 7+ memory CD4 T cells in RRMS NTZ+ patients was lower than in healthy donors but did not differ from its expression in RRMS NTZ- patients. 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 but did not differ from the expression found in healthy donors (Fig.5A, bottom row).

Since Th1/Th17 cells are defined by their co-expression of both Th1 and Th17-related factors, we next asked 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 NTZ+ 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.5B and C). 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.5B and C). Correlation analysis showed that clinical parameters only weakly accounted for the variation in the percentages of IFN $\gamma$ +IL-17+ and GM-CSF+IL-17+ memory CD4 T cells contained in the integrin  $\beta$ 7+ compartment ( $r^2$  values  $< 0.3$ ) (Supplementary Fig.5A and B). In addition, we observed that at equivalent clinical parameters (EDSS or disease duration), RRMS NTZ+ patients presented a higher percentage of IFN $\gamma$ +IL-17+ and GM-CSF+IL-17+ cells in their integrin  $\beta$ 7+ memory CD4 T cells compared to RRMS NTZ- patients (Supplementary Fig.5C and D).

These data show that natalizumab-treated patients present an augmentation in the proportion of circulating pro-inflammatory Th1/Th17 cells largely restricted to the integrin  $\beta$ 7+ memory CD4 T cells compartment. Correlation to clinical parameters furthermore supported a direct link between the increase of Th1/Th17 cells secreting pro-inflammatory cytokines in the integrin  $\beta$ 7+ compartment and natalizumab treatment.

## **Th1/Th17 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 multiple sclerosis patients and have been shown to have an advantage to cross the blood-brain barrier and access the CNS both in vitro and in vivo in EAE model.<sup>4</sup> Since the proportion of Th1/Th17 in integrin  $\beta$ 7<sup>+</sup> memory CD4 T cells in RRMS patients is increased under natalizumab, we aimed at determining the capacity of this cell subset to transmigrate through the human blood-brain barrier. To this end, we used a previously described<sup>23</sup> artificial in vitro model of blood-brain barrier based on a monolayer of hCMEC/D3, a human endothelial cell line derived from brain microvascular endothelial cells, grown on culture insert. Since the expression of the chemokine receptors CXCR3 et CCR6 is altered upon cell activation, we first sorted CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>-</sup>, CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>-</sup>, CXCR3<sup>-</sup>CCR6<sup>+</sup> and CXCR3<sup>+</sup>CCR6<sup>+</sup> memory CD4 T cells from healthy donor PBMCs and labelled them with CellTrace<sup>TM</sup> Violet. The labeled subsets together with autologous PBMCs were then stimulated overnight for optimal activation of the integrins<sup>35</sup> and the migratory capacity of the different subsets was assessed. We determined that int. $\beta$ 7<sup>+</sup> Th1/Th17 cells transmigrated more efficiently than int. $\beta$ 7<sup>+</sup> Th1, Th2 and Th17 subsets and int. $\beta$ 7<sup>-</sup> Th2 and Th17 cells and as efficiently as int. $\beta$ 7<sup>-</sup> Th1/Th17 and Th1 cells through the hCMEC/D3 layer (Fig.6). In contrast, int. $\beta$ 7<sup>+</sup> Th1 and Th2 subsets displayed a lower capacity to transmigrate compare to their int. $\beta$ 7<sup>-</sup> counterparts ( $p < 0.001$  and  $p < 0.01$  respectively, Mann-Whitney test). These data suggest that int. $\beta$ 7<sup>+</sup> Th1/Th17 cells possess a similar capacity as int. $\beta$ 7<sup>-</sup> Th1/Th17 cells to transmigrate across the blood-brain barrier and could therefore play an important pathogenic role in multiple sclerosis.

## Discussion

In this study, we demonstrated that the increased proportion of circulating proinflammatory Th1/Th17 cells as well as IL-17+IFN $\gamma$ + and IL-17+GM-CSF+ memory CD4 T cells previously described in RRMS patients under natalizumab is mainly coming from an alteration of the 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<sup>+</sup> memory CD4 T cells into the CNS in EAE have produced inconsistent results probably due to differences in the models and experimental procedures used.<sup>36-39</sup> Similarly, whether integrin  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 can switch its ligand specificity from MAdCAM-1 to VCAM-1 in vivo under inflammatory conditions, as described in vitro,<sup>40</sup> remains to be determined. Nonetheless, integrin  $\beta$ 7<sup>+</sup> lymphocytes are

observed in significant proportion in human CSF including in multiple sclerosis patients.<sup>21,22</sup> Here, we determined that, in absence of natalizumab treatment, int.β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells express int.β1 at low levels compared to int.β7<sup>-</sup> memory CD4 T cells. While these levels are inferior to those expressed by int.β7<sup>-</sup> memory CD4 T cells under natalizumab, further studies are required to determine whether they permit or facilitate the transmigration of memory CD4 T cells across the blood-brain barrier in the presence of physiological levels on integrin α4. Beside their low expression of integrin β1, we showed that integrin β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells express integrin β2 at levels similar to those present on int.β7<sup>-</sup> memory CD4 T cells. In EAE, studies in mice deficient for integrin α4 or treated with an anti-integrin α4 antibody showed that integrin α4 is critical for the trafficking of Th1 but not 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 αLβ2)<sup>41,42</sup> indicating that Th17 cells can migrate into the CNS in an integrin α4β1-independant LFA-1-dependant manner. However, whether integrin αLβ2 and/or integrin α4β1 and/or alternate mechanisms<sup>40,43</sup> are involved in the migration of integrin β7<sup>+</sup> CD4 T cells into the CNS remains to be determined.

Under natalizumab, the downregulation of the expression of integrin β2 we observed in our study on int.β7<sup>-</sup> memory CD4 T cells as well as the previously described downregulation of the expression of integrin αL on CD4 T cells<sup>6</sup> suggest that the downregulation of both integrin α4β1 and integrin αLβ2 account for the reduced migration of int.β7<sup>-</sup> memory CD4 T cells into the CNS under natalizumab. Our results show that, under natalizumab, int.β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells downregulate their expression of integrin β2 in a more pronounced manner than integrin β7<sup>-</sup> memory CD4 T cells ( $p < 0.001$ ). This downregulation of integrin αLβ2 might therefore be of particular relevance to limit the capacity of integrin β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells to migrate into the CNS under natalizumab.

Concerning the properties of int.β7<sup>+</sup> memory CD4 T cells in healthy donors, we found that the proportions of Th1/Th17 cells and memory CD4 T cells expressing the pro-inflammatory cytokines IFNγ, MIP-1β, TNFα and IL-22 were higher in the integrin β7<sup>+</sup> compartment than in the int.β7<sup>-</sup> compartment. In contrast, a lower proportion of int.β7<sup>+</sup> 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.

Studies on human PBMCs from healthy donors and multiple sclerosis patients using in vitro transmigration assay have demonstrated that among CD4 T cells subsets, Th1/Th17 have the highest ability to cross the blood-brain barrier in vitro.<sup>4,44</sup> Our results of 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/Th17 memory CD4 T cells migrated as efficiently as integrin  $\beta 7^-$  Th1/Th17. Kebir et al.<sup>4</sup> showed that Th1/Th17 cells co-expressing IFN $\gamma$  and IL-17 but also ROR $\gamma$ t and T-bet are present in the CNS of multiple sclerosis 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 multiple sclerosis patients furthermore confirmed that Th1/Th17 cells are abundant in the CNS and CSF in multiple sclerosis patients.<sup>3</sup> Confirming the importance of Th1/Th17 cells in multiple sclerosis pathogenesis, circulating CCR6+ myelin-reactive CD4 T cells from multiple sclerosis patients show an enhanced production of GM-CSF, IL-17A and IFN $\gamma$  compared to healthy controls<sup>45</sup> and GM-CSF deficient mice have been shown to be resistant to the induction of EAE<sup>46</sup>.

While studies on blood samples from RRMS NTZ- 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>47-49</sup> we did not observe such modifications in our study neither on int. $\beta 7^-$  nor on int. $\beta 7^+$  memory CD4 T cells. This discrepancy is most likely due to the fact that the RRMS NTZ- patients enrolled in our study (Table 1) were mainly in remitting phase and either treated with immunomodulatory / immunosuppressive drugs or at an early stage of the disease.<sup>50</sup>

Under natalizumab, previous studies have shown that memory CD4 T cells sequestered in periphery display increased proinflammatory properties such as an elevated expression of CCR6 (expressed by Th17 and Th1/Th17 cells) and an increased expression of IL-17, IFN $\gamma$  and TNF $\alpha$  upon CD3 stimulation.<sup>10</sup> Longitudinal study further showed that the proportion of a subpopulation of Th1/Th17 cells (CXCR3+CCR6+CCR4- cells) as well as the proportion of Th1/Th17 cells co-expressing IFN $\gamma$  and GM-CSF are increased in the blood of RRMS patients following natalizumab therapy.<sup>3</sup> In the present study, we found that natalizumab treatment induced an increase of the proportion of Th1/Th17 cells specifically in memory CD4 T cells expressing integrin  $\beta 7$ . Int. $\beta 7^+$  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>27,32,34</sup> In addition, we 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/Th17 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 phenotype and cytokine expression profile were not observed in the integrin  $\beta 7^-$  compartment. Our results show that integrin  $\beta 7^+$  positive memory CD4 T cells present in the circulation of multiple sclerosis patients under natalizumab display a pro-inflammatory phenotype and could therefore play a pathogenic role in the rebound of the disease observed in 20% of RRMS patients at natalizumab discontinuation.<sup>8,9</sup>

Whether the alteration of the properties of circulating memory CD4 T cells described in untreated RRMS patients<sup>47-49</sup> are mainly restricted to int. $\beta 7^+$  memory CD4 T cells as we observed under natalizumab and whether integrin  $\beta 7^+$  memory CD4 T cells play an active role in multiple sclerosis pathogenesis remains to be determined. Nonetheless, studies in mouse models and on human samples support a role of gut CD4 T cells in the pathogenesis of multiple sclerosis with an impact of the composition of the gut microbiota on their properties. Indeed, studies in mice have shown that alterations in the composition of the gut microbiota largely modify the susceptibility to EAE<sup>51,52</sup> with the composition of the gut microbiota altering the pathogenic properties of the lymphocytes localized in the gut but also in the CNS. In mouse models of autoimmune diseases such as autoimmune renal disease and autoimmune arthritis, gut-derived lymphocytes have been shown to migrate to target organs and participate to the disease pathogenesis.<sup>16,17</sup> In EAE, IgA-producing plasmacells localized in the CNS were shown to partly originate from the gut and suppress neuroinflammation.<sup>18</sup> In the opticospinal encephalomyelitis mouse model, Smad7 overexpression in intestinal CD4 T cells promote autoimmunity and favor the expansion and migration of intestinal CD4 T cells into the CNS with more than 40% of the CD4 T cells present in the spinal cord lesions originating from the intestine.<sup>19</sup> In humans, using gut microbiota from monozygotic human twin pairs discordant for multiple sclerosis, Berer et al. have shown that the transfer in germ-free mice of gut microbiota from multiple sclerosis-affected twins induce a significantly higher incidence of spontaneous EAE compared to the microbiota of the healthy co-twins.<sup>53</sup> Gut microbiota-specific IgA+ B cells were furthermore found to traffic to the CNS in active multiple sclerosis patients<sup>22</sup> while memory CD4 T cells expressing the gut-homing receptors CCR9 were detected in the CSF of multiple sclerosis patients.<sup>20</sup>

In conclusion, while the pathogenicity of integrin  $\beta 7^+$  CD4 T cells in multiple sclerosis is not defined in human, studies in mouse models and in humans support a role of these cells in the development of the disease. Our study, by evidencing a specific dysregulation of the integrin  $\beta 7^+$  compartment in RRMS patients point out to a role of gut-derived CD4 T cells in multiple sclerosis pathogenesis notably at the interruption 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. 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
4. 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
5. 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
6. 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
7. 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
8. 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
9. 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
10. Kivisäkk P, Healy BC, Vigiotta 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



11. Ghosh S, Goldin E, Gordon FH, et al. Natalizumab for active Crohn's disease. *The New England journal of medicine*. Jan 2 2003;348(1):24-32. doi:10.1056/NEJMoa020732
12. 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
13. 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.
14. Erle DJ, Briskin MJ, Butcher EC, Garcia-Pardo A, Lazarovits AI, Tidswell M. Expression and function of the MAdCAM-1 receptor, integrin alpha 4 beta 7, on human leukocytes. *Journal of immunology*. Jul 15 1994;153(2):517-28.
15. Schweighoffer T, Tanaka Y, Tidswell M, et al. Selective expression of integrin alpha 4 beta 7 on a subset of human CD4+ memory T cells with Hallmarks of gut-tropism. *Journal of immunology*. Jul 15 1993;151(2):717-29.
16. 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
17. 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
18. 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
19. Haupeltshofer 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
20. 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
21. Kivisakk 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

22. 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
23. 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
24. Rott LS, Briskin MJ, Andrew DP, Berg EL, Butcher EC. A fundamental subdivision of circulating lymphocytes defined by adhesion to mucosal addressin cell adhesion molecule-1. Comparison with vascular cell adhesion molecule-1 and correlation with beta 7 integrins and memory differentiation. *Journal of immunology*. May 15 1996;156(10):3727-36.
25. 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
26. 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
27. 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.
28. 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
29. 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
30. 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
31. Trabattoni D, Saresella M, Pavecchi 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
32. 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

33. 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
34. 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
35. 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
36. 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
37. 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
38. 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
39. 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
40. 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
41. 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
42. 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
43. 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

44. 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

45. 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

46. 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

47. 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

48. 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

49. 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

50. Durelli L, Conti L, Clerico M, et al. T-helper 17 cells expand in multiple sclerosis and are inhibited by interferon-beta. *Annals of neurology*. May 2009;65(5):499-509. doi:10.1002/ana.21652

51. 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

nature10554 [pii]

52. 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

1000082107 [pii]

53. Berer K, Gerdes LA, Cekanaviciute E, et al. Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proceedings of the*

## Figure legends

### **Figure 1: 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 cytometry plots showing the expression of integrin  $\alpha 4$  in memory CD4 T cells and the expression of integrin  $\beta 7$  in int. $\alpha 4^+$  memory CD4 T cells (gray filled histogram). The black thick line histogram represents the integrin  $\beta 7$  expression on cells pre-incubated with an unlabeled anti-integrin  $\beta 7$  antibody. (B) Representative flow cytometry plot showing the expression of integrin  $\beta 1$  and integrin  $\beta 7$  on int. $\alpha 4^+$  memory CD4 T cells. (C) Overlay showing the expression of integrin  $\beta 1$  in int. $\alpha 4^+$ int. $\beta 7^-$  and int. $\alpha 4^+$ int. $\beta 7^+$  memory CD4 T cells preincubated (black thick line) or not (gray filled) with an unlabeled anti-integrin  $\beta 1$  antibody. The gray thin line histograms represent the FMO (Fluorescence Minus One) control for integrin  $\beta 1$  staining. (D) MFI of integrin  $\beta 1$  on int. $\alpha 4^+$ int. $\beta 7^-$  and int. $\alpha 4^+$ int. $\beta 7^+$  memory CD4 T cells in healthy individuals (n=61). (E) Representative flow data of CXCR3 and CCR6 expression on CXCR5- int. $\beta 7^-$  and CXCR5- int. $\beta 7^+$  memory CD4 T cells. (F) Percentages of Th1 (CXCR3+CCR6-), Th2 (CXCR3-CCR6-), Th17 (CXCR3-CCR6+) and Th1/Th17(CXCR3+CCR6+) cells in int. $\beta 7^-$  and int. $\beta 7^+$  CXCR5- memory CD4 T cells for healthy donors (n=61) (G) Percentages of int. $\beta 7^-$  and int. $\beta 7^+$  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) after PMA and Ionomycin stimulation. Paired Student *t* test and one-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

### **Figure 2: Natalizumab treatment induces the retention of integrin $\beta 7^+$ memory CD4 T cells in periphery.**

(A) Absolute numbers per  $\mu$ l of blood of CD4 T cells, memory CD4 T cells, int. $\beta 7^-$  and int. $\beta 7^+$  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  $\alpha 4$  expression in memory CD4 T cells and of integrin  $\beta 7$  expression on int. $\beta 7^+$  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 from 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 3: Natalizumab treatment decreases the expression of brain-homing molecules at the surface of integrin β7+ memory CD4 T cells.**

(A) Overlays of integrin α4, 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 control). (B) Median of fluorescence intensity of integrin α4, 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 4: Integrin β7+ memory CD4 T cells from RRMS patients treated with natalizumab contain an increased proportion of Th1/Th17.**

(A) Percentages of Th1, Th2, Th17, Th1/Th17 in int.β7- (top row) and 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 CD226, PD-1 and ICOS expressing cells in int.β7- (top row) and int.β7+ (bottom row) memory CD4 T cells of healthy donors (n=61-62), RRMS NTZ- (n=24-33) and RRMS NTZ+ (n=32-38) patients. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test.

**Figure 5: Integrin β7+ memory CD4 T cells from RRMS patients under natalizumab display an increased capacity to express GM-CSF, IL-17A and IL-22.**

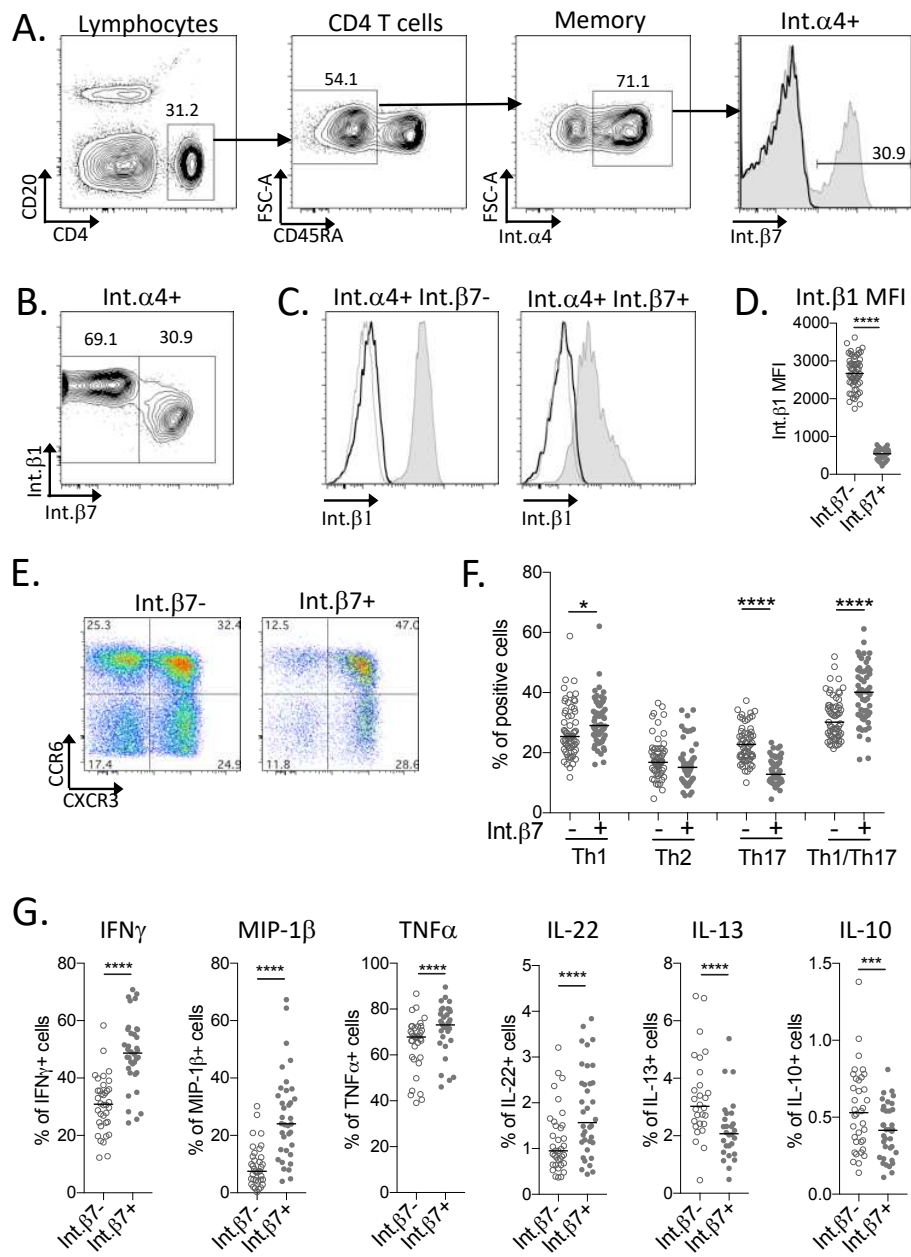
(A) Percentages of int.β7- (top row) and int.β7+ (bottom row) memory CD4 T cells expressing GM-CSF, IL-17A, IL-17F, IL-22, IFNγ and IL-10 after PMA and Ionomycin stimulation in healthy volunteers (n=32-36), RRMS NTZ- (n=10-13) and RRMS NTZ+ (n=31-36) patients. (B) Representative flow cytometry plot of the expression of IFNγ and IL-17A (top row) and of GM-CSF and IL-17A (bottom row) by int.β7+ memory CD4 T cells in a healthy donor, a RRMS NTZ- and a RRMS NTZ+ patient. (C) Percentages of IFNγ+IL-17A+ and of GM-CSF+IL-17A+ cells in int.β7+ memory CD4 T cells in healthy donors (n=32), RRMS NTZ- (n=10) and RRMS NTZ+ (n=31) patients. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple

comparison test.

**Figure 6: Th1/Th17 CD4 T cells expressing integrin  $\beta 7^+$  display a high capacity to transmigrate through an in vitro model of blood-brain barrier.**

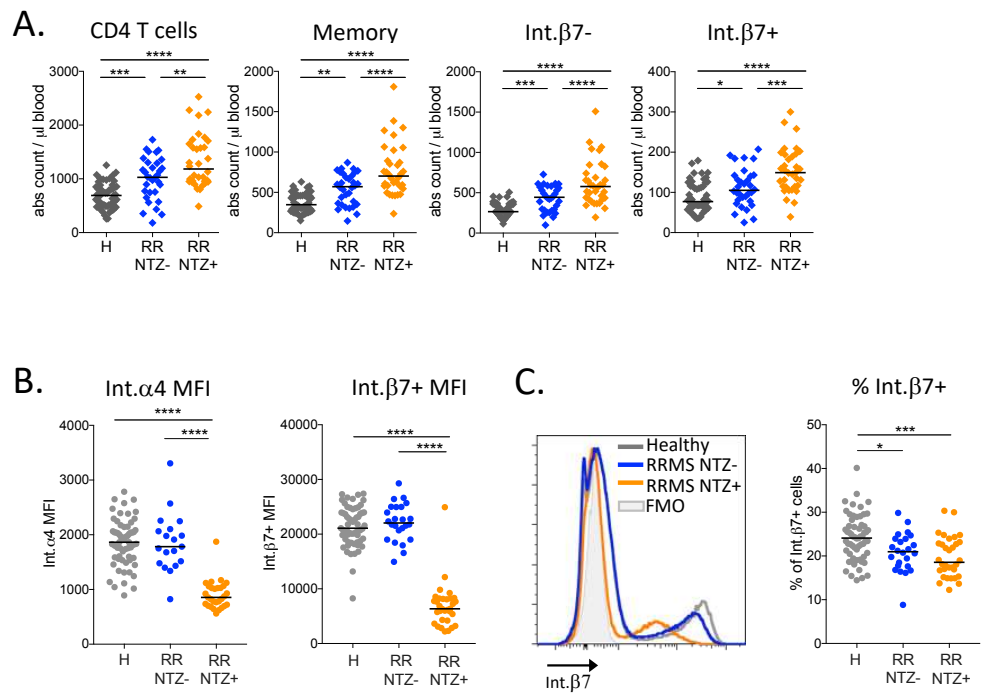
Percentages of migration of the indicated Th subsets expressing or not int. $\beta 7$  across a monolayer of hCMEC/D3 pre-stimulated for 24 hours with TNF $\alpha$ . Data from 4 experiments each performed in triplicate with a different healthy donor are shown in scattered dot plot. Floating bar (min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

# Figures

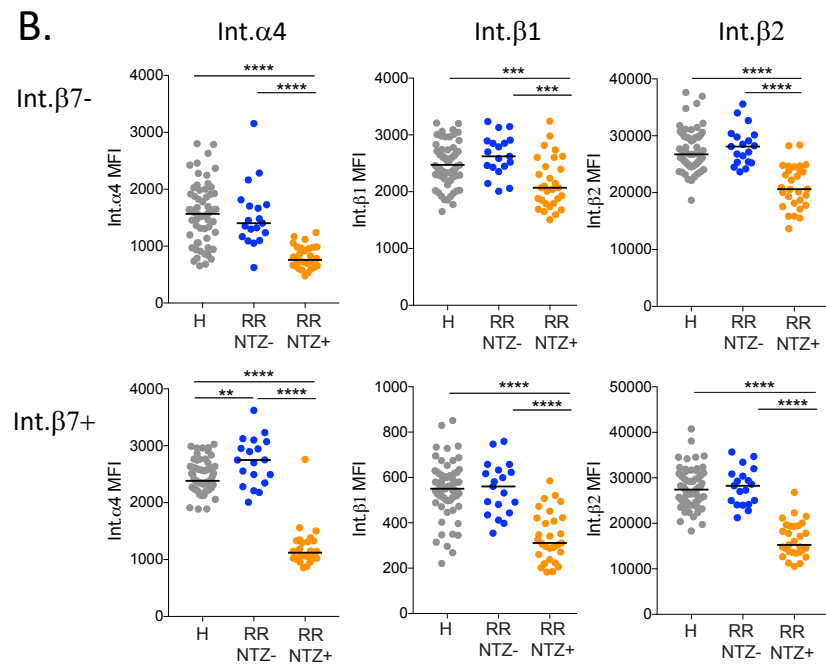
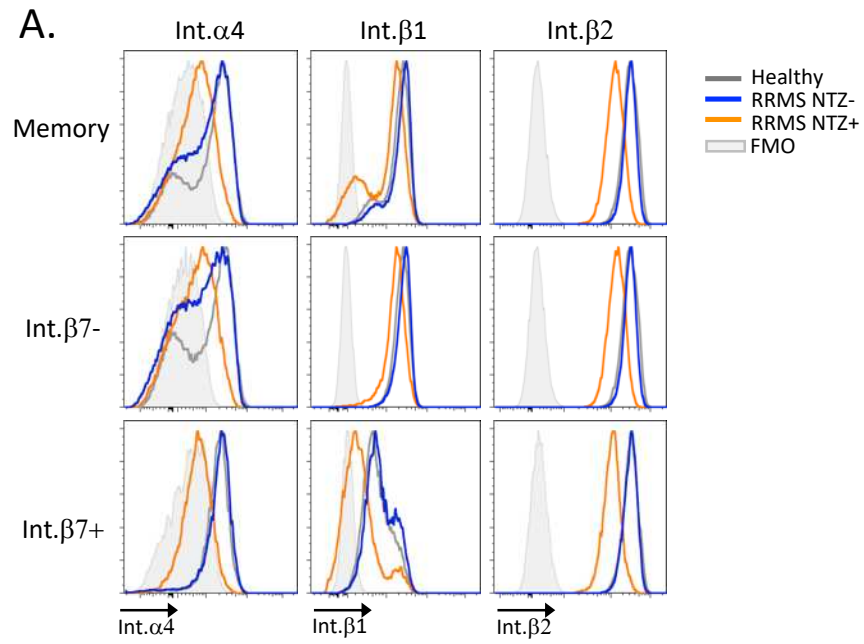


**Figure 1**

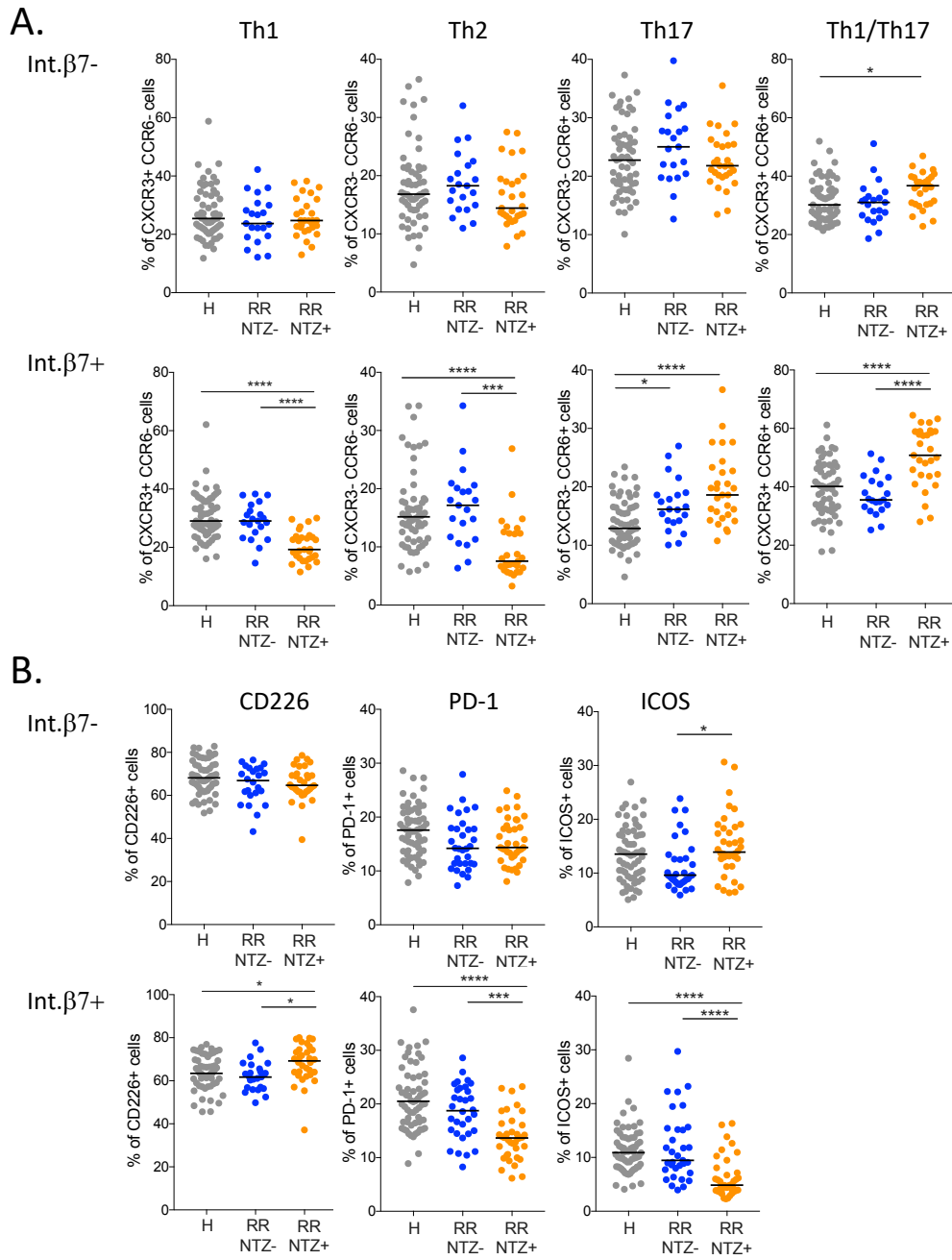




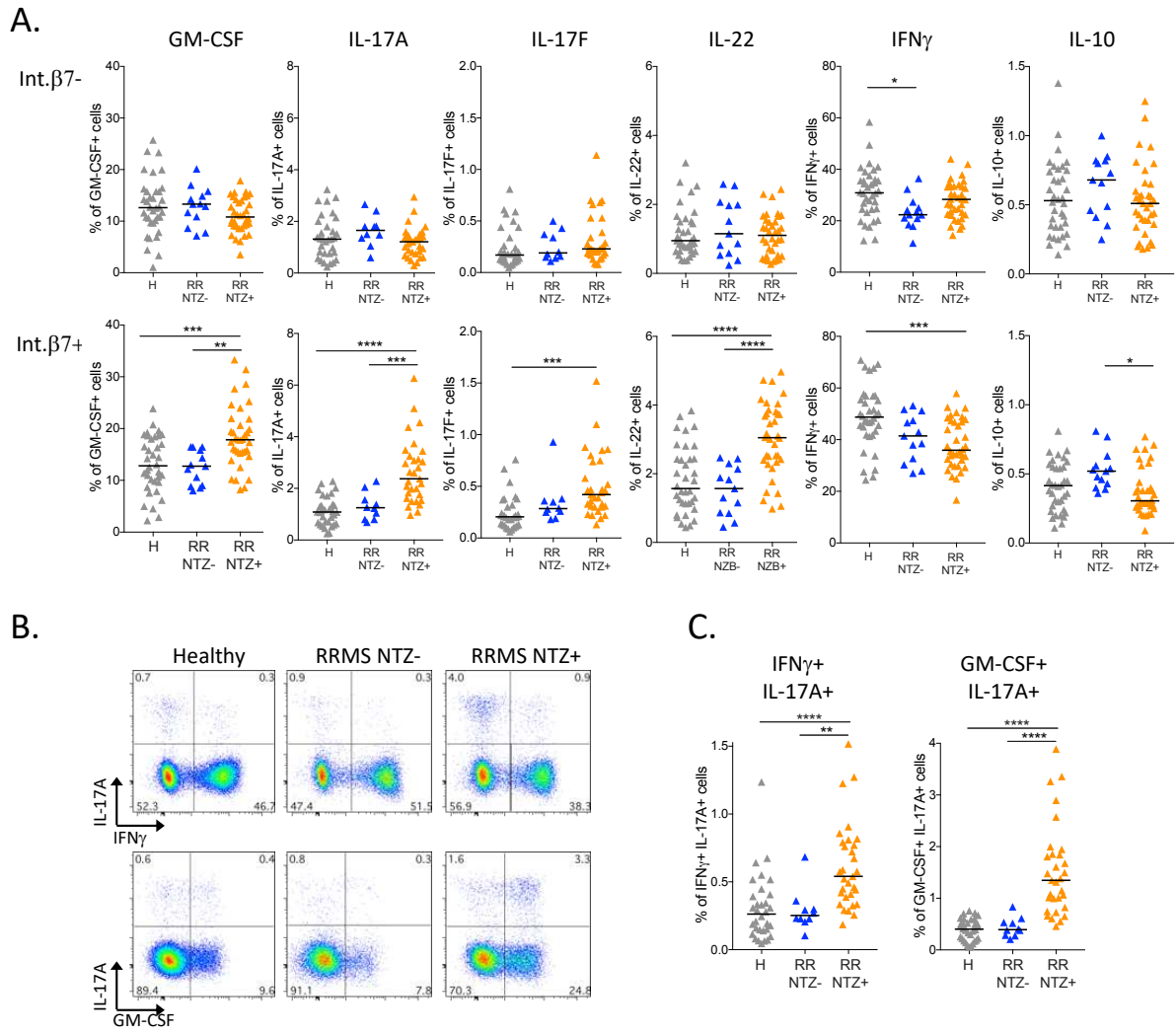
**Figure 2**



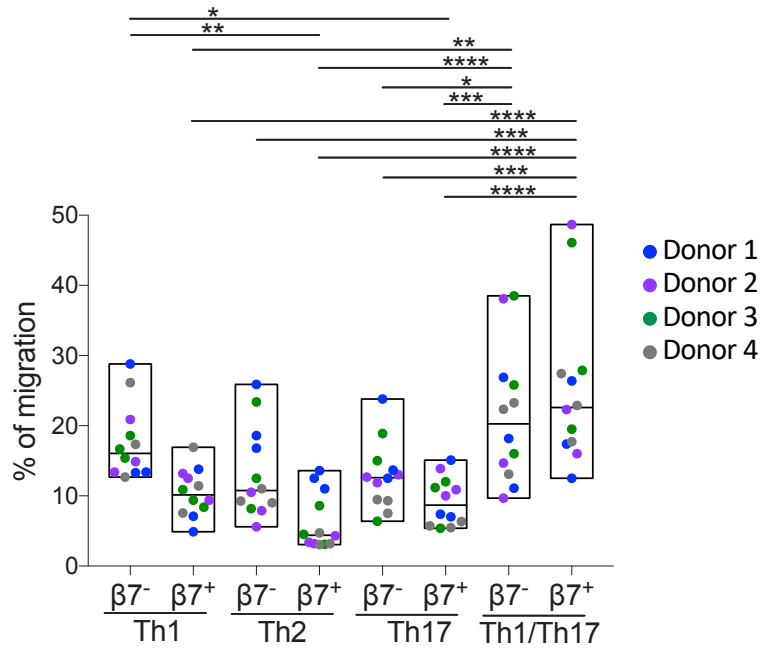
**Figure 3**



**Figure 4**



**Figure 5**

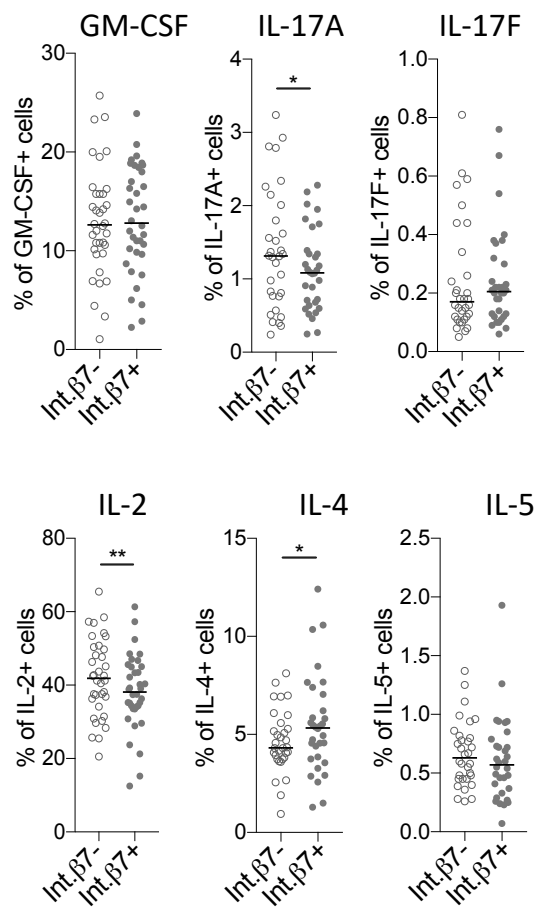


**Figure 6**

**Table 1: clinical and demographic characteristics of the patients**

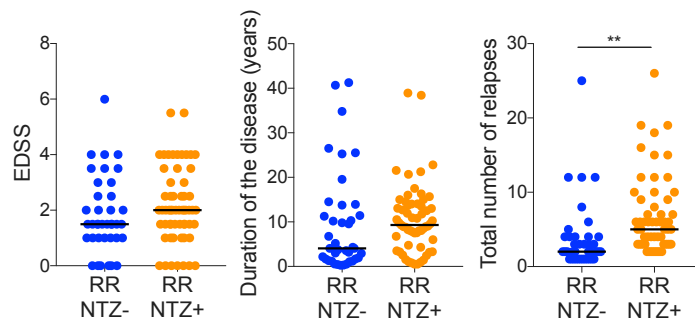
	<b>Healthy donors</b>	<b>RRMS NTZ-</b>	<b>RRMS NTZ+</b>
<b>Number of donors</b>	94	39	59
<b>M/F</b>	53/41	9/30	19/40
<b>Age</b> (median $\pm$ SD)	42 ( $\pm$ 12)	37 ( $\pm$ 13)	35 ( $\pm$ 10)
<b>Disease duration</b> (months: median $\pm$ SD)		49 ( $\pm$ 133)	110 ( $\pm$ 93)
<b>EDSS</b> (median and range)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

## Supplementary figures



### Supplementary Figure 1: The cytokine expression profile of integrin $\beta 7^-$ and integrin $\beta 7^+$ differs at steady state.

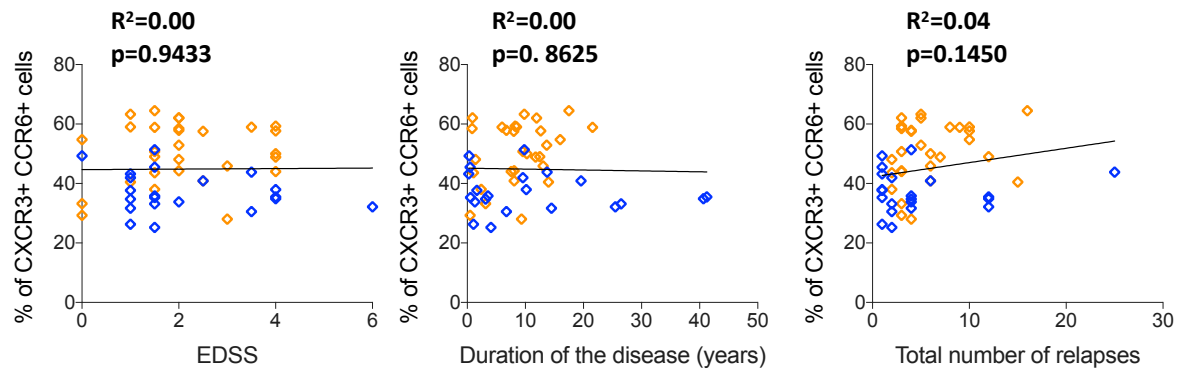
Percentages of integrin  $\beta 7^-$  and integrin  $\beta 7^+$  memory CD4 T cells expressing GM-CSF, IL-17A, IL-17F, IL-2, IL-4 and IL-5 in healthy donors. Paired Student *t* test.



**Supplementary Figure 2: RRMS patients under NTZ display a higher number of past relapses compared to untreated or under first-line therapies RRMS patients.**

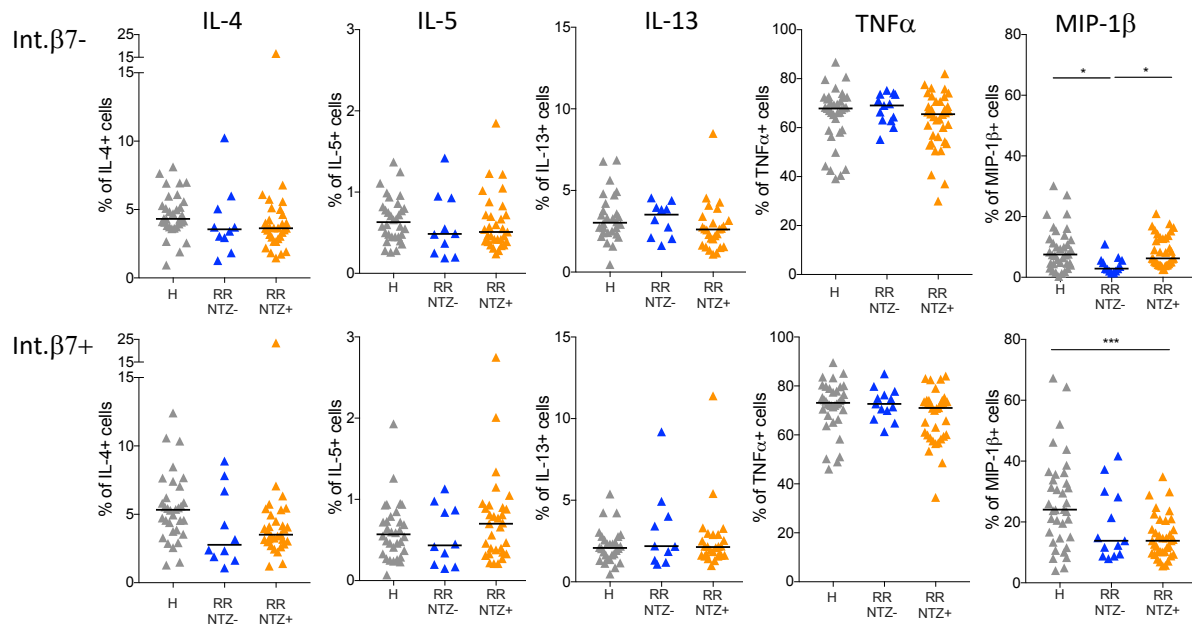
EDSS, duration of the disease and total number of relapses of RRMS NTZ- and RRMS NTZ+ patients included in the study. Unpaired Student t test.





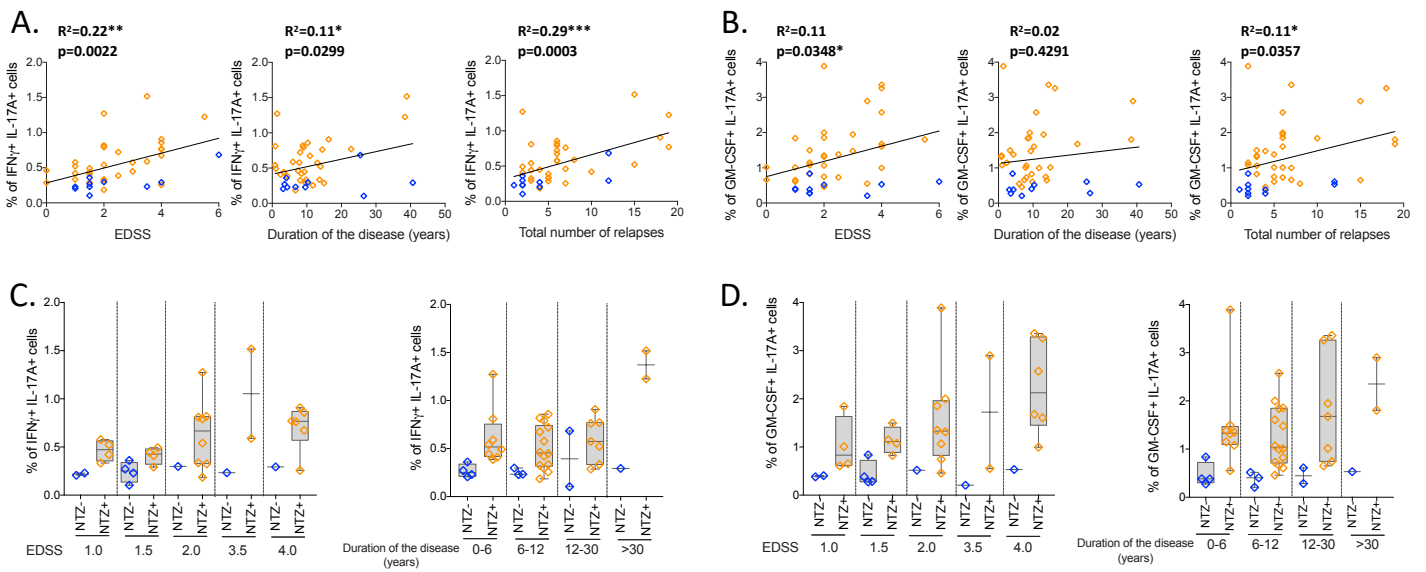
**Supplementary Figure 3: The percentages of Th1/Th17 cells in the integrin  $\beta 7+$  memory CD4 T cell compartment does not correlate with clinical parameters.**

Correlations in RRMS patients between the percentages of CXCR3+CCR6+ (Th1/Th17) cells among int.  $\beta 7+$  memory CD4 T cells and the EDSS score, the duration of the disease and the number of past relapses. Each dot represents a sample from an individual subject (RRMS NTZ-: blue symbols, RRMS NTZ+: orange symbols). Linear regression are indicated by black solid lines.



**Supplementary Figure 4: The expression of Th2 cytokines is not altered in RRMS NTZ+ patients compared to RRMS NTZ- patients and healthy donors.**

Percentages of integrin  $\beta$ 7- (top row) and integrin  $\beta$ 7+ (bottom row) memory CD4 T cells expressing IL-4, IL-5, IL-13, TNF $\alpha$  and MIP-1 $\beta$  in healthy donors, RRMS NTZ- and RRMS NTZ+ patients. One-way ANOVA followed by Tukey's multiple comparison test



**Supplementary Figure 5: The percentages of IFN $\gamma$ +IL-17A+ and GM-CSF+IL-17A+ cells in the integrin  $\beta$ 7+ memory CD4 T is higher in RRMS NTZ+ patients than in clinically-matched RRMS NTZ- patients**

(A-B) Correlations between the percentages of IFN $\gamma$ +IL-17A+ (A) and GMCSF+IL-17A+ (B) cells contained in integrin  $\beta$ 7+ memory CD4 T and clinical parameters: EDSS score, duration of the disease and number of past relapses. Each dot represents a sample from an individual subject (blue symbols for RRMS NTZ- patients, orange symbols for RRMS NTZ+ patients). Linear regression are indicated by black solid lines. (C-D) Comparison of the percentages of IFN $\gamma$ +IL-17A+ (C) and GMCSF+IL-17A+ (D) cells in integrin  $\beta$ 7+ memory CD4 T cells in NTZ- (blue) and NTZ+ (orange) RRMS patients with similar EDSS values or range of disease duration.

# Discussion

L'objectif de ce travail était de déterminer le potentiel pathogénique des LB dérivés de l'intestin dans la SEP. Les LB intestinaux étant peu décrits dans la littérature, nous nous sommes tout d'abord intéressés aux propriétés des LB dérivés de l'intestin chez les individus sains avant de les comparer aux propriétés des LB intestinaux de patients SEP. Au vu des mécanismes pathogéniques des LB proposés dans la SEP, nous nous sommes intéressés à la capacité des LB dérivés de l'intestin à se différencier en plasmocytes et à sécréter des anticorps, mais également à leur fonction de cellule présentatrice d'antigène et leur profil cytokinique.

Au cours de notre étude, nous avons constaté une plus forte proportion de LB CD27+IgD+ dans le compartiment intégrine  $\beta 7+$  que dans le compartiment intégrine  $\beta 7-$ . Une étude chez des lapins a montré que les GALT sont nécessaires pour le développement des LB CD27+IgD+ de la zone marginale<sup>311</sup>. Chez l'homme, il est proposé que les LB MZ diversifient leur BCR dans les GALT au contact des bactéries du microbiote intestinal<sup>312</sup>. Il a été également montré qu'un des précurseurs des LB CD27+IgD+, les LB T2 IgM<sup>fort</sup>, expriment l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$  ce qui favorise leur localisation dans les GALT<sup>313</sup>. Ainsi, la plus grande proportion de LB CD27+IgD+ dans le compartiment intégrine  $\beta 7+$  dans le sang des individus sains pourrait s'expliquer par l'importance des GALT dans leur développement. La proportion importante de LB CD27+IgD+ dans le compartiment intestinal est en accord avec la capacité importante de ces cellules à répondre aux antigènes bactériens.

Des études montrent que dans des maladies auto-immunes les LB CD27+IgD+ peuvent être impactés. En effet, il a été observé une diminution de la proportion des LB CD27+IgD+ circulants chez des patients PAR, et également chez des patients lupiques actifs, suggérant une implication de ces cellules dans des pathologies auto-immunes présentant une dysbiose<sup>79,313</sup>. Chez les patients SEP, les données de la littérature concernant les LB CD27+IgD+ sont peu nombreuses. Guerrier et al, montrent une proportion de LB CD27+IgD+ comparable entre les donneurs sains et les patients SEP en phase RRMS<sup>314</sup>. Cependant, Haas et al, montrent une diminution des LB CD27+IgD+ dans la circulation chez des patients en phase RRMS active, comparé à des donneurs sains et à des patients en RRMS en rémission<sup>173</sup>. Toutefois, la proportion de LB naïfs est augmentée chez les patients actifs et est diminuée chez les patients en rémission, ce qui pourrait expliquer le changement de proportion des LB CD27+IgD+. Ces

données divergentes peuvent aussi s'expliquer par l'activité de la maladie puisque dans l'étude de Guerrier et al., la majorité des patients (22/31) ne présentait pas d'évolution clinique ou radiologique récente. Dans notre cohorte, nous n'avons pas observé de différence dans la proportion de LB CD27+IgD+ ou des LB CD27+IgD- totaux chez les patients RRMS par rapports aux donneurs sains. Nous n'avons également pas observé de différence de la proportion des LB CD27+IgD+ et des LB CD27+IgD- exprimant l'intégrine  $\beta 7$  chez les patients SEP en phase RRMS ou PPMS comparé aux donneurs sains. En revanche, la proportion de LB CD27+IgD+ dans le compartiment des LB CD27+ exprimant l'intégrine  $\beta 7$  était légèrement plus faible chez les patients en phase SPMS que chez les donneurs sains, tandis que la proportion de LB CD27+IgD- était en retour légèrement augmentée chez les patients SPMS. Il serait intéressant d'inclure de nouveaux patients afin de confirmer significativement ces tendances. Il serait également important de déterminer le nombre absolu de LB CD27+ IgD- et CD27+ IgD+ présents dans le compartiment intégrine  $\beta 7$  de façon à identifier quelle population est responsable du shift observé chez les patients en phase SPMS. La légère diminution de la proportion des LB CD27+IgD+ exprimant l'intégrine  $\beta 7$  et la légère augmentation des LB CD27+IgD- intégrine  $\beta 7$  dans la circulation sanguine dans la SEP en phase SPMS suggère que les LB CD27+ intestinaux pourraient être impliqués dans la pathogenèse de la maladie. La dysbiose, décrite chez les patients SEP, pourrait être responsable d'une augmentation de l'activation des LB CD27+IgD- et/ou des LB CD27+IgD+ ce qui conduirait à une altération de leur proportion dans la circulation sanguine<sup>301</sup>. Il est aussi intéressant de noter que ce shift est observé uniquement en phase SPMS suggérant que les LB CD27+IgD- dérivés de l'intestin pourraient être impliqués dans la formation et/ou le maintien des ELS méningés. Concernant la proportion de LB CD27+IgD+ exprimant l'intégrine  $\beta 7$  en phase RRMS, il serait intéressant de voir si la proportion de ces cellules est différemment impactée en fonction de l'activité de la maladie comme décrit par Haas et al. dans les LB totaux. En effet, une étude montre que le LCR de patients présentant une SEP RRMS stable est enrichie en LB CD27+IgD+ par rapport au sang, suggérant une migration de ces cellules dans le SNC de patients SEP et leur implication dans la pathogenèse de la maladie<sup>173</sup>. Cependant, il est à noter que les auteurs observent une diminution de la fréquence de LB naïfs dans le LCR de patients par rapport au compartiment sanguin, ce qui pourrait donc expliquer l'augmentation relative de la proportion de LB CD27+IgD+ dans le LCR de patients SEP. Pröbstel et al, ont mis en évidence la présence de plasmocytes sécréteurs d'IgA dans le LCR de patients SEP en phase RRMS active<sup>8</sup>. Ces plasmocytes expriment majoritairement l'intégrine  $\beta 7$  indiquant une migration des LB

d'origine intestinale, et donc potentiellement des LB CD27+IgD+ dans le SNC de patients SEP<sup>218</sup>. Ces données suggèrent donc que les LB CD27+IgD+ intestinaux pourraient participer à l'inflammation dans le SNC en phase RRMS. De plus, la corrélation entre la présence d'ELS ectopiques en phase SPMS et la gravité de la maladie suggère une potentielle activité pathogénique des LB CD27+IgD- dérivés de l'intestin dans le SNC de patients<sup>315</sup>. Il serait donc intéressant de déterminer si les LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7^+$  et les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta 7^+$  migrent préférentiellement dans le SNC des patients SEP par rapport à leur homologue n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$ , et si cette migration est différente selon l'activité et les phases de la maladie. Nous avons observé, chez les donneurs sains, que les LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7^+$  et les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta 7^+$  exprimaient les intégrines  $\beta 1$  et  $\beta 2$  (données non montrées) nécessaires à la migration à travers la BHE<sup>126</sup>. Dans ce sens, il est intéressant d'étudier leur présence dans le LCR de patients SEP mais également de déterminer leur capacité de migration *in vitro* à l'aide d'un modèle de transmigration à travers la BHE et la BHM<sup>132</sup>. Nous avons réalisé des expériences de transmigration *in vitro* avec des cellules endothéliales de la microvasculaire cérébrale humaine, mimant la BHE (données non montrées). Après 8h de migration, nous avons observé que les LB CD27+IgD- et les LB CD27+IgD+ étaient capables de migrer à travers la monocouche de cellules endothéliales et que les LB intestinaux migraient dans les mêmes proportions que les LB non intestinaux chez les donneurs sains. Nous n'avons pas observé de différence de migration entre les LB de donneurs sains et de patients en phase RRMS. Cependant, nous avons constaté une plus forte migration des LB totaux et des LB CD27+IgD- exprimant l'intégrine  $\beta 7$  de patients en phase SPMS par rapport à ceux de donneurs sains. Ces données suggèrent donc que la migration des LB CD27+IgD- intestinaux dans la SNC pourrait être augmentée en phase SPMS. Cependant, ces résultats sont à prendre avec prudence puisque nous avons observé une migration des LB naïfs, dans notre modèle, équivalente à celle des LB CD27+, aussi bien chez les donneurs sains que les patients SEP, suggérant que notre modèle ne récapitule pas l'ensemble des propriétés de la BHE *in vivo*, puisque une plus faible proportion de LB naïfs est observée dans le LCR de patients SEP que dans la circulation sanguine<sup>173</sup>. Il est cependant possible que la plus faible proportion de LB naïfs détectée dans le LCR soit due à une différenciation *in situ* des LB naïfs ayant migré dans le SNC en LB mémoires éventuellement pathogéniques.

Pour étudier la fonction de cellule présentatrice d'antigène des différentes populations de LB, nous avons analysé l'expression des molécules de co-stimulations (CD80, CD86, CD40 et HLA-DR) par les LB intestinaux tout d'abord chez des donneurs sains. Nous n'avons pas observé de différence de niveaux d'expression de ces molécules entre les LB CD27+IgD- et les LB CD27+IgD+, qu'ils soient intestinaux ou non intestinaux. Ces résultats suggèrent que l'expression de ces molécules n'est pas impliquée dans une éventuelle différence de capacité de présentation de l'antigène par ces cellules. Nous n'avons pas non plus observé de différence d'expression de CD80, CD86, CD40 et HLA-DR entre les LB CD27+ totaux dérivés ou non de l'intestin après une stimulation avec de l'anti-BCR, du CD40L et du CpG pendant 48h. Cependant, la stimulation *in vitro* que nous avons utilisé est relativement forte, il n'est donc pas exclu qu'une stimulation *in vivo* ou plus physiologique *in vitro* induise une expression différentielle de ces molécules. Toutefois, nous avons observé que les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ produisent plus de cytokines inflammatoires que les LB CD27+IgD+ n'exprimant pas l'intégrine  $\beta$ 7, ce qui pourrait conférer un signal 3 d'activation pour les LT CD4 plus fort aux LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+, et augmentant donc la capacité de présentation d'antigène de ces LB. Cela concerne également les LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7+ qui produisent plus de cytokines inflammatoires que leur homologue intégrine  $\beta$ 7-. Chez les patients SEP en phase RRMS, nous avons constaté une tendance non significative à une plus forte expression de HLA-DR par les LB CD27+IgD- et LB CD27+IgD+ exprimant ou non l'intégrine  $\beta$ 7, comparé aux LB de sujets sains. Il serait intéressant d'augmenter le nombre de donneurs étudiés afin de confirmer cette tendance. Ces données, si elles se confirment, suggèrent une capacité augmentée des LB à présenter l'antigène aux LT CD4 chez les patients SEP via HLA-DR. Cependant, nous ne retrouvons pas d'augmentation de l'expression des molécules de co-stimulations (CD80, CD86, CD40) par les LB de patients décrite dans la littérature chez les patients SEP en phase RRMS active<sup>202,203</sup>. Ceci peut s'expliquer par la différence dans les cohortes utilisées. En effet, la majorité des patients RRMS inclus dans notre étude sont sous traitements et/ou n'ont pas eu de poussées récentes contrairement aux études citées. Nos données portent donc sur une analyse phénotypique suggérant une fonction identique des LB CD27+IgD- et LB CD27+IgD+ dérivés ou non de l'intestin mais ne permettent pas de déterminer leur fonction directe de cellule présentatrice d'antigène. Il serait intéressant de réaliser des tests de prolifération en isolant les différentes populations de LB et les LT CD4 de deux donneurs différents (culture allogénique) et/ou de même donneur en présence d'un super-antigène comme le SEB (culture autologue) pour déterminer l'effet des différentes populations de LB sur la prolifération des LT. De plus,

il serait informatif de réaliser des expériences avec les différentes populations de LB de patients SEP et les LT CD4 de donneurs sains afin d'étudier si les LB de patients SEP impactent la prolifération des LT CD4. En outre, une étude a montré que les LB de patients RRMS étaient impliqués dans l'auto-prolifération des LT CD4 par contact cellulaire médié par HLA-DR<sup>316</sup>. En effet, après isolement et mise en culture des PBMC de patients SEP et de donneurs sains, les auteurs ont pu observer une prolifération des LT CD4, LT CD8 et LB plus importante chez les patients en rémission par rapport aux patients en rechute et aux donneurs sains. Les LB prolifératifs ont été ensuite isolés par tri cellulaire et mis en culture avec des PBMC dépourvus de LB du même individu et une plus forte prolifération des LT CD4 a été observée. L'utilisation d'un anticorps anti-HLA-DR induisait, de plus, une forte diminution de l'auto-prolifération des LT CD4, suggérant que le contact LB/LT CD4 via HLA-DR est nécessaire pour induire l'auto-prolifération des LT CD4. Il serait donc intéressant de voir si les LB intestinaux de donneurs sains et de patients SEP sont capables d'induire différents niveaux d'auto-prolifération des LT CD4. De plus, au vu des récentes études montrant l'implication de l'EBV dans le développement de la SEP et du potentiel mimétisme moléculaire pour les auto-antigènes neuronaux que conférerait une infection à l'EBV<sup>113,114</sup>, l'auto-prolifération des LT CD4 impliquant les LB pourrait être due à la présence de LB spécifiques de l'EBV. Il serait donc intéressant de comparer l'auto-prolifération des PBMC de patients EBV positifs avec celle de patients EBV négatifs avec comme contrôle des donneurs sains présentant une sérologie positive ou négative. L'ensemble de ces conditions de cultures représentent une stimulation plus physiologique et pourraient permettre de mieux étudier le rôle de cellule présentatrice d'antigène des LB intestinaux.

Les GALT sont les sites de production préférentiel des IgA impliquant notamment les cellules dendritiques. En effet, en plus d'induire l'expression de l'intégrine  $\alpha 4\beta 7$ , les DC sont impliquées dans la génération d'IgA, notamment via la production d'acide rétinoïque<sup>264</sup>. De plus, la composition du microbiote intestinal influence la production d'IgA. En effet, des souris « germ free » ont un niveau d'IgA drastiquement diminué. En revanche, la monocolonisation des souris « germ free » avec la bactérie SFB rétablit la production d'IgA, indiquant que la modulation du microbiote intestinal impacte la production d'IgA<sup>317</sup>. Notre étude montre, chez les sujets sains, une plus faible proportion de LB CD27+IgD- dérivés de l'intestin exprimant des IgG à leur surface, mais une plus forte proportion de ces cellules exprimant des IgA, ce qui est donc en accord avec leur localisation intestinale. Nous avons également observé que les LB



CD27+IgD<sup>-</sup> exprimant l'intégrine  $\beta 7$  proliféraient moins et se différenciaient moins en plasmocytes, comparé à leur homologue intégrine  $\beta 7$ - après stimulation avec de l'anti-BCR, du CD40L et de l'IL-21. Cependant, les LB CD27+IgD<sup>-</sup> intégrine  $\beta 7$ <sup>+</sup> se différenciaient certes moins en plasmocytes mais produisaient en moyenne 2,7 fois plus d'IgA2 que les LB CD27+IgD<sup>-</sup> non intestinaux. Cela est en accord avec la concentration importante d'IgA2 au niveau de l'intestin et indique que les LB intestinaux participent au maintien de l'intégrité de la muqueuse intestinale<sup>46</sup>. Nous montrons également que les LB CD27+IgD<sup>-</sup> provenant de l'intestin prolifèrent moins et se différencient moins en plasmocytes lorsqu'ils sont stimulés directement par des TFh. Toutefois, comme lors des précédentes expériences, les LB CD27+IgD<sup>-</sup> Int.  $\beta 7$ <sup>+</sup> produisaient en plus grande quantité des IgA indépendamment de l'origine intestinale ou non des TFh. Les propriétés de prolifération et de sécrétion d'IgG et d'IgA des LB CD27+IgD<sup>-</sup> observées en culture après stimulation avec de l'anti-BCR, CD40L et CpG ne semblent donc pas différentes de celles observées après une restimulation par des TFh, qu'ils soient d'origine intestinale ou non.

Les données du laboratoire montrent que les TFh Int.  $\beta 7$ <sup>+</sup> ont une capacité d'aide aux LB naïfs minime par rapport à celle des TFh Int.  $\beta 7$ <sup>-</sup> chez les donneurs sains (données non montrées). De manière intéressante, les TFh Int.  $\beta 7$ <sup>+</sup> de patients en phase SPMS ont, par contre, une capacité d'aide des LB naïfs similaire à celle des TFh Int.  $\beta 7$ <sup>-</sup> de donneurs sains. Cette capacité d'aide aux LB naïfs des TFh Int.  $\beta 7$ <sup>+</sup>, augmentée en phase SPMS, pourrait s'accompagner d'une capacité accrue à induire la différenciation en plasmocytes et/ou la production d'IgA par les LB CD27<sup>+</sup> intestinaux. Ce mécanisme pourrait expliquer la proportion plus élevée de LB CD27+IgD<sup>-</sup> Int.  $\beta 7$ <sup>+</sup> exprimant des IgA observée chez les patients SPMS comparé aux donneurs sains et aux patients RRMS. Dans un contexte pathogénique, les LB CD27+IgD<sup>-</sup> Int.  $\beta 7$ <sup>+</sup> pourraient donc bénéficier de l'aide des TFh intestinaux mais aussi non intestinaux pour se différencier en plasmocytes sécréteurs d'IgA dans des organes cibles. De plus, il serait intéressant de déterminer le type d'IgA produite par les différentes populations de LB stimulées par des TFh intestinaux et non intestinaux (données en cours d'obtention). Ces données suggèrent donc que les LB CD27+IgD<sup>-</sup> intestinaux peuvent répondre, avec la même amplitude, à une stimulation provenant de TFh intestinaux ou non, ce qui pourrait favoriser leur potentielle réactivation en dehors de l'intestin ou des sites apparentés aux GALT.

Dans la SEP, des études se sont intéressées au rôle des plasmocytes sécréteur d'IgA. Il a été notamment montré, dans le modèle EAE, que des plasmocytes intestinaux sécréteur d'IgA migrent depuis l'intestin vers le SNC des souris. De manière intéressante, les auteurs ont

observé que les plasmocytes sécréteur d'IgA d'origine intestinale participaient à réguler l'inflammation du SNC via la production d'IL-10<sup>217</sup>. Chez l'homme, il a été montré une augmentation de la concentration d'IgA et de plasmocytes IgA<sup>+</sup> dans le LCR de patients SEP en phase RRMS active, comparé aux patients en phase RRMS inactive<sup>218</sup>. Les auteurs, en accord avec les données observées chez la souris, montrent l'infiltration dans le SNC de plasmocytes IgA<sup>+</sup> exprimant l'IL-10 qui pourraient donc participer à réguler l'inflammation neuronale dans le SNC de patients SEP lors des poussées. Les auteurs montrent que les plasmocytes IgA<sup>+</sup> présent dans le SNC expriment majoritairement le gène qui code pour l'intégrine  $\beta 7$  et qu'ils reconnaissent des antigènes bactériens et non neuronaux, confirmant la migration de cellules intestinales au sein du SNC de patients SEP. Ces deux études, combinées à l'échec thérapeutique de l'Atacicept, suggèrent un rôle régulateur des plasmocytes sécréteurs d'IgA dans la SEP. Nos données montrent une plus forte proportion de LB CD27+IgD- exprimant des IgA de surface spécifiquement dans le compartiment intégrine  $\beta 7$ <sup>+</sup> chez les patients SEP ainsi qu'une forte production d'IL-10 par les LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7$ <sup>+</sup> chez les donneurs sains. Il serait donc intéressant de déterminer en parallèle la concentration d'IL-10 dans le surnageant de culture après différenciation des LB CD27+IgD- Int.  $\beta 7$ <sup>+</sup> et leur production d'IgA, ceci chez les patients SEP et chez les donneurs sains.

Concernant les LB CD27+IgD<sup>+</sup>, nous avons constaté une très faible expression des IgG et IgA membranaires à leur surface, ce qui est en accord avec le fait que plus de 96% d'entre eux expriment des IgM membranaires (données non montrées). Nous avons observé que les LB CD27+IgD<sup>+</sup> étaient capables de se différencier en plasmocytes, mais plus faiblement que les LB CD27+IgD<sup>-</sup>, après stimulation (anti-BCR, CD40L, CpG). Au sein des LB CD27+IgD<sup>+</sup>, nous avons montré que les LB intestinaux se différenciaient moins en plasmocytes, tout en produisant une plus forte quantité d'IgA2 que les LB CD27+IgD<sup>+</sup> Int.  $\beta 7$ <sup>-</sup>. La stimulation utilisée fait appel aux signaux du BCR, ainsi nous avons observé, par microarray, que les LB CD27+IgD<sup>+</sup> Int.  $\beta 7$ <sup>+</sup> exprimaient plus faiblement des gènes impliqués dans la voie de signalisation du BCR, ce qui pourrait contribuer à expliquer la plus faible activation et donc prolifération et différenciation de ces cellules. De plus, lorsque les LB CD27+IgD<sup>+</sup> sont cultivés en présence de TFh, leur différenciation en plasmocytes semble moins importante lorsqu'ils sont originaires de l'intestin. Néanmoins, après stimulation par des TFh, les LB CD27+IgD<sup>+</sup> Int.  $\beta 7$ <sup>+</sup> produisent plus d'IgG et d'IgA que leur homologue non intestinaux. Cette production d'anticorps est cependant largement plus faible par rapport à celle des LB

CD27+IgD-, suggérant ainsi que la production d'anticorps n'est pas la fonction principale des LB CD27+IgD+ ou que les conditions de stimulation utilisées ne sont pas optimales. En effet, Bautista et al., utilisent une stimulation indépendante de l'activation des LT avec du CpG, de l'IL-2, de l'IL-6 de l'IL-10 et des fibroblastes pour étudier la prolifération et la différenciation des LB CD27+IgD+<sup>31</sup>. Cependant, *in vitro*, nos expériences montrent que les LB CD27+IgD+ sont capables de recevoir de l'aide des TFh, et peuvent donc être impliqués dans des réponses dépendantes des LT. Il est à noter que les LB CD27+IgD+ ont les molécules nécessaires (HLA-DR et CD40 notamment) pour avoir un contact avec les TFh, ce qui pourrait expliquer qu'elles soient capables de recevoir leur aide *in vitro*. *In vivo*, des données indiquent que les LB CD27+IgD+ intestinaux peuvent effectuer des passages brefs dans des centres germinatifs des GALT pour diversifier leur BCR, suggérant que ces cellules peuvent être en contact avec les TFh et recevoir ainsi leur aide<sup>31,34</sup>. Toutefois, les LB CD27+IgD+ sont constitués en majorité de LB MZ mais contiennent également à hauteur de 3,5%, des LB CD27+IgD+ n'exprimant des IgM qu'à de faibles niveaux appelés « IgD only » dont la fonction n'est encore pas connue<sup>8</sup>. Les « IgD only » sont présentes chez 2% des LB CD27+IgD+ Int.  $\beta 7^+$ , et en moyenne chez 6% des LB CD27+IgD+ Int.  $\beta 7^-$ . Il est donc envisageable que la production d'IgG et d'IgA, que nous observons dans les cultures de LB CD27+IgD+, provienne des LB « IgD only ». Il serait donc pertinent de réaliser, de la même manière que Bautista et al., une stimulation T indépendante avec du CpG, de l'IL-2, IL-6, IL-10 des LB CD27+IgD+IgM+ afin de déterminer si les LB « IgD only » sont impliqués dans la production d'anticorps observée dans les cultures de LB CD27+IgD+<sup>31</sup>.

Nos résultats, chez les donneurs sains, indiquent que les LB CD27+IgD+ possèdent une capacité de sécrétion de cytokines inflammatoires, activatrices et régulatrices plus importante comparé aux LB CD27+IgD-. Ces données sont en accord avec le fait que les LB CD27+IgD+ sont des cellules qui doivent répondre rapidement à des antigènes, indépendamment de l'aide des LT CD4. D'autre part, nous avons montré que les LB CD27+IgD+ et les LB CD27+IgD- intestinaux ont un profil plus inflammatoire que leur homologue n'exprimant pas l'intégrine  $\beta 7$  avec notamment plus de sécrétion d'IL-6, de TNF $\alpha$  et de LT $\alpha$ . Les LB CD27+IgD+ et LB CD27+IgD- intestinaux produisent également plus de BAFF, facteur d'activation des LB, suggérant une activation des LB intestinaux plus importante. Cependant, les LB intestinaux présentent également un profil plus régulateur que les LB non intestinaux, en sécrétant notamment une cytokine connue pour son rôle régulateur, l'IL-10. La particularité du

microenvironnement intestinal, lié à la présence d'un important microbiote, entraîne une stimulation constante pour les cellules présentes au niveau des GALT ce qui pourrait expliquer de manière générale le profil, plus inflammatoire mais également plus régulateur des LB intestinaux, qui apparaît nécessaire au maintien de l'homéostasie dans des conditions d'expositions importantes aux pathogènes.

Ce profil inflammatoire des LB intestinaux pourrait également être impliqué dans le signal 3 d'activation des LT CD4 lors d'une présentation antigénique comme discuté précédemment, via notamment la production d'IL-6 qui est impliquée dans la différenciation des LT CD4 en Th17. De manière surprenante, nous avons observé que les LT CD4 naïfs exprimaient plus de cytokines inflammatoires lorsqu'ils étaient cultivés avec des LB CD27+IgD- Int.  $\beta$ 7- que nous n'avons pourtant pas caractérisés comme les LB les plus inflammatoires. Les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+, quant à eux, sont les cellules qui induisaient une expression de cytokines inflammatoires plus faible par les LT CD4 naïfs. Nous avons constaté les mêmes résultats, avec une différence plus faible entre les conditions, avec les LT CD4 mémoires. Ces résultats peuvent s'expliquer par la plus forte capacité de sécrétion d'IL-10 par les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+, qui pourrait limiter l'expression de cytokines inflammatoires des LT CD4 naïfs et favoriser également leur expression d'IL-10. Il serait intéressant de bloquer l'IL-10 afin de voir si, dans ces conditions, les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ induisent une polarisation des LT CD4 en faveur d'un profil inflammatoire. Les LB, intestinaux ou non, ne semblent pas capables d'induire de façon prononcée la différenciation des LT naïfs en sous type de LT CD4 distinct (Th1, Th2 ou Th17). Afin de déterminer le réel impact et potentiel « effet bystander » des cytokines produites par les LB, nous avons également réalisé des expériences avec le surnageant de culture des différentes populations de LB (stimulés par de l'anti-BCR, du CD40L, et des CpG durant 48h), que nous avons déposés sur des LT CD4 naïfs ou mémoires (données non montrées). Nous avons réalisé plusieurs expériences avec ou sans pré-activation des LT CD4 avec des billes anti-CD3/CD28 et avons déterminé l'expression des cytokines par les LT après 4 jours de culture. Dans ces conditions, nous avons observé aucune différence du profil cytokinique des LT CD4 avec les surnageants des différentes populations de LB. Nous avons émis l'hypothèse que les concentrations plus importantes d'IL-6, de TNF $\alpha$  et de LT $\alpha$  dans le surnageant des LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ pouvaient induire la génération ou la polarisation des LT en LT CD4 inflammatoires notamment Th1, Th17 et Th1/Th17. Cependant les cytokines produites par les LB ne sont peut-être pas en quantité suffisante pour avoir un effet sur la polarisation des LT CD4. Il est également possible que les LT CD4, même mémoires, aient manqué de signaux nécessaires à leur polarisation. En effet, pour se

différencier en Th17, les LT naïfs ont besoin d'IL-23, d'IL-1 $\beta$ , de TGF $\beta$  et d'IL-6<sup>318</sup>. Les LB ne sont pas décrits dans la littérature comme produisant de l'IL-23 ou de l'IL-1 $\beta$ . Le TGF $\beta$  peut, par contre, être produit par les LB<sup>319</sup>, mais nous n'avons pas mesuré sa concentration dans les surnageants de culture des LB. Il serait donc intéressant de voir si du TGF- $\beta$  est sécrété par les LB stimulés, et s'il est produit en plus grande quantité par les LB intestinaux, ce qui est probable puisqu'une étude chez la souris montre que le TGF $\beta$  produit par les LB est important pour la production d'IgA intestinale<sup>320</sup>. Enfin, il serait intéressant de voir si l'ajout d'IL-23 et/ou d'IL-1 $\beta$  et/ou de TGF $\beta$  en complément du surnageant des LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ induit préférentiellement une polarisation des LT CD4 naïfs en Th17 par rapport au surnageant des LB CD27+IgD+Int.  $\beta$ 7- supplémentés avec les mêmes cytokines. Dans le cas où un nombre plus important de Th17 serait observé, il serait également intéressant de bloquer l'IL-6 présent en plus grande quantité dans le surnageant de LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ en présence des cytokines exogènes pour déterminer l'impact de l'IL-6 sécrétée par les LB sur la génération de Th17. Les cytokines IL-12 et IL-4 sont nécessaires pour la génération de Th1 et Th2 respectivement<sup>318</sup>. Nous n'avons pas détecté ces cytokines dans le surnageant des cultures de LB, suggérant que les LB n'induisent pas directement la polarisation des LT CD4 naïfs en Th1 et Th2. Cependant, il est possible que les cytokines produites par les LB agissent indirectement sur la polarisation des LT CD4. En effet, une étude montre que le GM-CSF produit par les LB entraîne la production d'IL-12 par les macrophages, ce qui pourrait induire la polarisation des LT CD4 en Th1<sup>321</sup>. Il serait donc intéressant de réaliser des expériences de Transwell, avec les LT CD4 dans la chambre du haut et des PBMC déplétés ou non en LB dans la chambre du bas. Les PBMC avec ou sans LB seraient activés avec de l'anti-BCR, du CD40L et du CpG. Cette expérience pourrait mettre en évidence un effet indirect des LB sur la polarisation des LT CD4, par exemple via l'activation de macrophages sécréteurs d'IL-12.

Par ailleurs, les cytokines produites notamment par les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+, peuvent avoir d'autres effets comme l'induction de l'activation des LT CD4 plutôt que leur polarisation. En effet, des études montrent que les LB, via la production de TNF $\alpha$  et de LT $\alpha$  sont capables d'induire la prolifération et l'activation des LT (CD69+)<sup>55,206</sup>. La LT $\alpha$  est également impliquée dans la formation de ELS<sup>322</sup>, suggérant que les LB intestinaux pourraient favoriser la formation de ELS via la production de LT $\alpha$  dans des pathologies tel que la SEP.

Une étude montre que les LB de patients SEP en phase RRMS sécrètent plus d'IL-6 par rapport à des individus sains<sup>207</sup>. En accord avec ces données, nous montrons qu'une plus grande proportion de LB CD27+ totaux expriment l'IL-6 chez certains patients en phase RRMS comparé aux sujets sains. De façon intéressante, nos résultats montrent que cette augmentation de l'expression de l'IL-6 est particulièrement évidente dans les LB exprimant l'intégrine  $\beta 7$ . Ces données suggèrent qu'une plus forte production d'IL-6 par les LB de patients SEP en phase RRMS dépend largement d'une capacité supérieure des LB dérivés de l'intestin à exprimer l'IL-6 chez ces patients. Nos données, associées aux données de la littérature, suggèrent donc une implication des LB producteurs d'IL-6 dérivés de l'intestin dans la SEP en phase RRMS. En effet, les souris dans lesquelles le gène de l'IL-6 a été invalidé sélectivement dans les LB développent une EAE-MOG atténuée, supportant une implication des LB producteurs d'IL-6 dans la SEP<sup>207</sup>. De plus, l'absence d'expression d'IL-6 par les LB est associée à une plus faible réponse inflammatoire des Th17, indiquant que l'IL-6 produite par les LB conduit l'inflammation dans ce modèle, notamment via une réponse inflammatoire des Th17. En accord avec ces données, les auteurs montrent que les LB de patients en phase RRMS, un an après avoir reçu du Rituximab, ont un niveau de production d'IL-6 diminué à un niveau similaire au niveau observé chez les donneurs sains, suggérant que les LB producteurs d'IL-6 sont impliqués dans la SEP. De plus la déplétion en LB, de PBMC de patients, induit une diminution de la concentration d'IL-17 sécrétée par les PBMC, suggérant l'implication des LB dans la réponse Th17 dans la SEP.

Nous avons également observé qu'une plus forte expression d'IL-6, par les LB dérivés de l'intestin, était associée à un déséquilibre des populations de TFh vers un phénotype associé aux pathologies auto-immunes<sup>323</sup>. En effet, les LB exprimant le plus d'IL-6 (ronds rouges plein, Figure 9A) ont un ratio de (TFh2+TFh17)/TFh1 élevé (données non montrées), suggérant une association entre une expression élevée d'IL-6 des LB dérivés de l'intestin et une capacité des TFh à aider les LB plus importante dans la SEP. Il est cependant à noter que cette association entre expression d'IL-6 par les LB intestinaux et le phénotype des TFh est retrouvée pour les TFh intégrine  $\beta 7^-$  et intégrine  $\beta 7^+$ . Enfin, des patients avec un haut ratio de TFh en faveur de l'aide aux LB n'ont pas nécessairement une proportion de LB exprimant l'IL-6 augmentée par rapport à des sujets sains. Il semble donc important de mener d'autres investigations pour déterminer si les TFh sont impliqués dans l'induction de la plus forte expression d'IL-6 par les LB dérivés de l'intestin chez les patients en phase RRMS.

Lors de notre deuxième série d'expériences, et au vu du profil inflammatoire des LB CD27+IgD+ Int.  $\beta 7^+$ , nous avons intégré un anticorps anti-IgD au panel de cytométrie. Nous

souhaitions déterminer si la plus forte expression d'IL-6 par les LB chez les patients provenait des LB CD27+IgD+ dérivées de l'intestin. Nous avons émis l'hypothèse que les CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ seraient majoritairement responsables de l'augmentation de l'expression d'IL-6 par les LB chez les patients SEP en phase RRMS puisque une dysbiose est décrite chez ces patients. En effet, les LB CD27+IgD+ étant spécialisés dans la réponse contre des bactéries, les propriétés de ces cellules pourraient donc être préférentiellement impactées lors d'une dysbiose. Ainsi, les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ pourraient donc jouer un rôle prépondérant dans le développement de la maladie. Néanmoins, nous n'avons pas observé une plus forte proportion de LB CD27+ totaux exprimant l'IL-6 chez les patients SEP par rapport aux individus sains dans cette deuxième cohorte de patients, probablement du fait de la faible activité de la maladie présente chez ces patients et/ou des traitements de fonds mis en place.

Les données de la littérature montrent également une expression augmentée de GM-CSF et une plus forte sécrétion de TNF $\alpha$  et de LT $\alpha$ , ainsi qu'une diminution de l'expression et de la sécrétion l'IL-10 par les LB de patient SEP en phase RRMS<sup>206,321</sup>. Cependant, nous n'avons pas observé de différence du taux d'expression de ces cytokines par les LB de patients en phase RRMS après une stimulation polyclonale avec de la PMA et de l'ionomycine. Les données indiquant une plus forte production d'IL-6, de LT $\alpha$ , de TNF $\alpha$  et une plus faible production d'IL-10 ont été obtenues en dosant les cytokines présentes dans le surnageant de culture de LB isolés de PBMC de patients SEP stimulés (anti-BCR, signalisation du CD40, CpG pendant 48h ou 72h). Nous avons observé chez les sujets sains que la stimulation des LB par le CD40L, des CpG et de l'anti-BCR permettait de détecter des différences de profil cytokinique au sein des différents types de LB non observable après une stimulation polyclonale des PBMC. Nous avons donc reproduit ces conditions de culture après isolement des différentes populations de LB de patients SEP mais nous n'avons pas observé de différence de production des cytokines précédemment citées entre les donneurs sains et les patients SEP. Ces résultats peuvent s'expliquer par le faible nombre de cellules des sous-populations de LB que nous avons obtenus après isolation à partir de PBMC de patients SEP. En effet, les différences de sécrétion entre les quatre populations de LB de donneurs sains étaient plus importantes lorsque  $5 \times 10^4$  cellules par puits étaient utilisés (**Figure 20**), que lors des expériences comprenant les patients SEP où nous n'avons pu cultivés que 5000 cellules par puits (**Figure 26B**). En accord avec cette hypothèse, les données de la littérature, montrant une différence de sécrétion de cytokines par les LB de patients et de donneurs sains, ont été obtenues avec  $7,5 \times 10^5$  LB totaux par puits de culture. Toutefois, les différences observées peuvent être également dues à des différences dans

les cohortes de patients étudiés puisque Guerrier et al, n'observent pas de sécrétion augmentée d'IL-6 chez les patients en phase RRMS non active<sup>314</sup>. Il serait donc intéressant de réaliser ces expériences sur des patients non traités et actifs afin de déterminer l'implication des LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ dans la production de cytokines pro-inflammatoire, notamment de l'IL-6 dans la SEP.

L'ensemble de nos données chez les patients SEP indique donc que les LB CD27+ dérivés de l'intestin jouent un rôle important dans la plus forte expression d'IL-6 par les LB de patients RRMS décrite dans la littérature. Cependant, nos expériences ne permettent pas de déterminer si les LB CD27+IgD+ et/ou les LB CD27+IgD- sont responsables de cette augmentation de l'expression d'IL-6 par les LB CD27+ Int.  $\beta$ 7+. Toutefois, nous avons observé que chez les donneurs sains, les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ sont les cellules produisant le plus d'IL-6, suggérant que ces cellules pourraient être responsables de l'augmentation de l'expression de l'IL-6 chez les patients SEP, notamment du fait de la dysbiose intestinale. Nos conditions de cultures ne nous ont pas, non plus, permis d'identifier si les LB dérivés de l'intestin étaient responsables de la plus forte production des autres cytokines inflammatoires (LT $\alpha$  et TNF $\alpha$ ) et/ou de la plus faible production d'IL-10 décrites dans la littérature chez les patients SEP en phase RRMS<sup>206</sup>. Cependant, les données que nous avons obtenues chez les sujets sains nous permettent de proposer que les LB CD27+IgD+ Int.  $\beta$ 7+ seraient impliqués dans l'augmentation de la production des cytokines inflammatoires par les LB chez les patients SEP.



# Conclusion générale

Le succès des immunothérapies anti-CD20 a mis en évidence un rôle des LB, indépendamment de leur production d'anticorps dans la SEP. Une meilleure caractérisation des propriétés pathogéniques des LB dérivés de l'intestin pourrait nous permettre de mieux comprendre la pathogenèse de cette maladie. Les résultats obtenus lors de notre étude apportent de nouvelles connaissances sur les caractéristiques des lymphocytes intestinaux, qui sont actuellement peu décrits dans la littérature. Nous confirmons tout d'abord que les LB intestinaux (CD27+IgD<sup>-</sup> et CD27+IgD<sup>+</sup>) de donneurs sains produisent plus d'IgA2 lorsqu'ils sont stimulés *in vitro* par rapport aux LB non intestinaux. Nous montrons également que les populations de LB intestinaux de donneurs sains ont un profil cytokinique plus inflammatoire et régulateur que les LB non intestinaux. De plus, les LB CD27+IgD<sup>+</sup> Int.  $\beta$ 7<sup>+</sup> produisent des quantités plus importantes d'IL-6, TNF $\alpha$ , LT $\alpha$ , BAFF et IL-10 par rapport aux autres populations de LB étudiés, et possèdent donc le profil cytokinique le plus inflammatoire et régulateur parmi ces populations. Dans un contexte pathologique, notamment dans la SEP, les LB CD27+IgD<sup>+</sup> intestinaux représentent donc une population d'intérêt qui pourrait participer à la fois à l'inflammation et à la régulation de la réponse immunitaire. Dans ce contexte, nous avons mis en évidence que les LB CD27<sup>+</sup> Int.  $\beta$ 7<sup>+</sup> étaient responsables de la plus forte production d'IL-6 par les LB chez les patients SEP. Des investigations supplémentaires sont nécessaires pour déterminer une éventuelle implication des LB CD27+IgD<sup>+</sup> Int.  $\beta$ 7<sup>+</sup> dans l'augmentation de l'expression d'IL-6 dans la SEP. Au vu des résultats que nous avons obtenus, à la fois chez les sujets sains et les patients SEP, et au vu des données de la littérature, nous proposons que les LB CD27+IgD<sup>+</sup> Int.  $\beta$ 7<sup>+</sup> sont pathogéniques dans la SEP en favorisent l'inflammation. Nous avons montré que les LB CD27+IgD<sup>-</sup> Int.  $\beta$ 7<sup>+</sup> produisaient plus d'IgA et plus d'IL-10 que les LB CD27+IgD<sup>-</sup> Int.  $\beta$ 7<sup>-</sup> suggérant que les LB CD27+IgD<sup>-</sup> Int.  $\beta$ 7<sup>+</sup> ont un rôle régulateur, et ils pourraient donc se différencier préférentiellement en plasmocytes IgA+IL-10<sup>+</sup>. Ainsi, les CD27+IgD<sup>-</sup> Int.  $\beta$ 7<sup>+</sup> pourraient être impliqués dans les phases actives de la SEP pour réguler l'inflammation dans le SNC. En revanche, les LB CD27+IgD<sup>-</sup> Int.  $\beta$ 7<sup>+</sup> pourraient avoir un rôle pathogénique en phase SPMS et être impliqués dans la formation d'ELS. Des investigations sont donc nécessaires pour valider ces hypothèses. Notre étude confirme l'intérêt d'étudier des populations de LB intestinaux dans des pathologies, où des dysbioses peuvent être observées.

La SEP étant une pathologie impliquant la migration de lymphocytes notamment de LT CD4 pathogéniques dans le SNC, des thérapies ont été développées afin d'inhiber la migration des lymphocytes à travers la BHE chez les patients en phase RRMS. Le Natalizumab est un anticorps monoclonal anti-intégrine  $\alpha 4$  qui bloque la migration des lymphocytes exprimant l'intégrine  $\alpha 4\beta 1$  à travers la BHE. Nous montrons, dans notre étude, que le phénotype et le profil cytokinique des LT CD4 dérivés de l'intestin est spécifiquement perturbé chez les patients traités par le Natalizumab. En effet, nous avons observé que les proportions de Th1/Th17, de LT CD4 co-exprimant l'IFN $\gamma$  et l'IL-17A et de LT CD4 co-exprimant l'IL-17A et le GM-CSF étaient augmentées exclusivement parmi les LT CD4 mémoires exprimant l'intégrine  $\beta 7$  chez les patients RRMS traités avec du Natalizumab par rapport aux patients RRMS non-traités par le Natalizumab et aux donneurs sains. Les LT CD4 exprimant l'intégrine  $\beta 7$  ont donc un profil inflammatoire sous Natalizumab et pourraient être impliqués dans le phénomène de rebond de la maladie observé chez 20% de patients RRMS à l'arrêt du traitement.

Par ailleurs, le Natalizumab pourrait également impacter les propriétés des LB dérivés de l'intestin. En effet, le Natalizumab bloque la migration des LT CD4 mais également des LB dans le SNC des patients SEP<sup>324</sup>. Ainsi, il a été observé une augmentation du nombre de LB, notamment des LB CD27+IgD- et des LB CD27+IgD+ présents dans la circulation sanguine des patients sous Natalizumab par rapport aux patients non traités<sup>325</sup>. Dans le LCR, une diminution de la proportion des LB et des LB CD27+IgD+ a également été observée sous Natalizumab<sup>326,327,328</sup>. De plus, les LB circulants des patients sous Natalizumab ont un degré d'activation et une production de cytokines pro-inflammatoires dont l'IL-6 et le TNF $\alpha$  plus importants que ceux des LB de patients non traités par le Natalizumab. Ces données suggèrent donc que sous Natalizumab, les LB dérivés de l'intestin présents dans la circulation sanguine pourraient, tout comme les LT CD4, présenter des caractéristiques pathogéniques accrues. Les LB dérivés de l'intestin pourraient donc être également impliqués dans le rebond de la maladie, observé chez 20% des patients ayant stoppé leur traitement.

L'origine intestinale des lymphocytes leur confère donc des propriétés différentes par rapport aux lymphocytes non intestinaux et ces lymphocytes pourraient donc jouer un rôle important dans le développement de maladies auto-immunes affichant une dysbiose. La communication entre les cellules du système immunitaire, telles que les LT CD4 et LB, peut permettre d'orienter une réaction immunitaire vers une réponse inflammatoire ou régulatrice. L'ensemble des populations lymphocytaires doit donc être pris en compte lors de l'étude d'une

pathologie auto-immune telle que la SEP et notamment les populations de lymphocytes provenant de l'intestin puisqu'une dysbiose est observée chez les patients. Cette dysbiose peut faire partie des facteurs responsables du développement de la pathologie ou être la conséquence de celle-ci. Ainsi, l'implication des lymphocytes intestinaux dans la pathogenèse de maladies auto-immunes peut être différente dans les phases précoce et tardive des maladies.

# Bibliographie

1. Pieper, K., Grimbacher, B. & Eibel, H. B-cell biology and development. *J. Allergy Clin. Immunol.* **131**, 959–971 (2013).
2. LeBien, T. W. B Cell Development. in *Fetal and Neonatal Physiology* 1202–1207 (Elsevier, 2017). doi:10.1016/B978-0-323-35214-7.00124-4.
3. LeBien, T. W. & Tedder, T. F. B lymphocytes: how they develop and function. *Blood* **112**, 1570–1580 (2008).
4. Wang, Y., Liu, J., Burrows, P. D. & Wang, J.-Y. B Cell Development and Maturation. *Adv. Exp. Med. Biol.* **1254**, 1–22 (2020).
5. Suryani, S. *et al.* Differential expression of CD21 identifies developmentally and functionally distinct subsets of human transitional B cells. *Blood* **115**, 519–529 (2010).
6. Melchers, F. Checkpoints that control B cell development. *J. Clin. Invest.* **125**, 2203–2210 (2015).
7. Merrell, K. T. *et al.* Identification of Anergic B Cells within a Wild-Type Repertoire. *Immunity* **25**, 953–962 (2006).
8. Sanz, I. *et al.* Challenges and Opportunities for Consistent Classification of Human B Cell and Plasma Cell Populations. *Front. Immunol.* **10**, 2458 (2019).
9. Crotty, S. T Follicular Helper Cell Differentiation, Function, and Roles in Disease. *Immunity* **41**, 529–542 (2014).
10. De Silva, N. S. & Klein, U. Dynamics of B cells in germinal centres. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 137–148 (2015).
11. Nutt, S. L., Hodgkin, P. D., Tarlinton, D. M. & Corcoran, L. M. The generation of antibody-secreting plasma cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 160–171 (2015).
12. Mesin, L., Ersching, J. & Victora, G. D. Germinal Center B Cell Dynamics. *Immunity* **45**, 471–482 (2016).
13. Feng, Y., Seija, N., Di Noia, J. M. & Martin, A. AID in Antibody Diversification: There and Back Again. *Trends Immunol.* **41**, 586–600 (2020).
14. Gatto, D. & Brink, R. The germinal center reaction. *J. Allergy Clin. Immunol.* **126**, 898–907 (2010).
15. 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).
16. Goenka, R. *et al.* Local BLYS production by T follicular cells mediates retention of high affinity B cells during affinity maturation. *J. Exp. Med.* **211**, 45–56 (2013).
17. Avery, D. T., Bryant, V. L., Ma, C. S., de Waal Malefyt, R. & Tangye, S. G. IL-21-induced isotype switching to IgG and IgA by human naive B cells is differentially regulated by IL-4. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **181**, 1767–1779 (2008).
18. L, M. & Sg, T. Cytokine-Mediated Regulation of Plasma Cell Generation: IL-21 Takes Center Stage. *Front. Immunol.* **5**, (2014).
19. Crotty, S. Follicular helper CD4 T cells (TFH). *Annu. Rev. Immunol.* **29**, 621–663 (2011).
20. Kurosaki, T., Kometani, K. & Ise, W. Memory B cells. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 149–159 (2015).
21. Halliley, J. L. *et al.* Long-Lived Plasma Cells Are Contained within the CD19(-)CD38(hi)CD138(+) Subset in Human Bone Marrow. *Immunity* **43**, 132–145 (2015).
22. Brynjolfsson, S. F., Mohaddes, M., Kärrholm, J. & Wick, M.-J. Long-lived plasma cells in human bone marrow can be either CD19+ or CD19-. *Blood Adv.* **1**, 835–838 (2017).
23. Weill, J.-C., Weller, S. & Reynaud, C.-A. Human marginal zone B cells. *Annu. Rev. Immunol.* **27**, 267–285 (2009).
24. Stadanlick, J. E. *et al.* Tonic B cell antigen receptor signals supply an NF- $\kappa$ B substrate for prosurvival BLYS signaling. *Nat. Immunol.* **9**, 1379–1387 (2008).
25. Pillai, S. & Cariappa, A. The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision. *Nat. Rev. Immunol.* **9**, 767–777 (2009).
26. Saito, T. *et al.* Notch2 is preferentially expressed in mature B cells and indispensable for

- marginal zone B lineage development. *Immunity* **18**, 675–685 (2003).
27. Hozumi, K. *et al.* Delta-like 1 is necessary for the generation of marginal zone B cells but not T cells in vivo. *Nat. Immunol.* **5**, 638–644 (2004).
  28. Descatoire, M. *et al.* Identification of a human splenic marginal zone B cell precursor with NOTCH2-dependent differentiation properties. *J. Exp. Med.* **211**, 987–1000 (2014).
  29. Cerutti, A., Cols, M. & Puga, I. Marginal zone B cells: virtues of innate-like antibody-producing lymphocytes. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 118–132 (2013).
  30. Kruezmann, S. *et al.* Human Immunoglobulin M Memory B Cells Controlling Streptococcus pneumoniae Infections Are Generated in the Spleen. *J. Exp. Med.* **197**, 939–945 (2003).
  31. Bautista, D. *et al.* Differential Expression of IgM and IgD Discriminates Two Subpopulations of Human Circulating IgM+IgD+CD27+ B Cells That Differ Phenotypically, Functionally, and Genetically. *Front. Immunol.* **11**, 736 (2020).
  32. Takizawa, M., Sugane, K. & Agematsu, K. Role of Tonsillar IgD+CD27+ Memory B Cells in Humoral Immunity Against Pneumococcal Infection. *Hum. Immunol.* **67**, 966–975 (2006).
  33. Weller, S. *et al.* Human blood IgM ‘memory’ B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire. *Blood* **104**, 3647–3654 (2004).
  34. Zhao, Y. *et al.* Spatiotemporal segregation of human marginal zone and memory B cell populations in lymphoid tissue. *Nat. Commun.* **9**, 3857 (2018).
  35. Reynaud, C.-A. *et al.* IgM memory B cells: a mouse/human paradox. *Cell. Mol. Life Sci. CMLS* **69**, 1625–1634 (2012).
  36. Weller, S. *et al.* CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **98**, 1166–1170 (2001).
  37. Chappell, C. P., Draves, K. E., Giltiy, N. V. & Clark, E. A. Extrafollicular B cell activation by marginal zone dendritic cells drives T cell-dependent antibody responses. *J. Exp. Med.* **209**, 1825–1840 (2012).
  38. Song, H. & Cerny, J. Functional heterogeneity of marginal zone B cells revealed by their ability to generate both early antibody-forming cells and germinal centers with hypermutation and memory in response to a T-dependent antigen. *J. Exp. Med.* **198**, 1923–1935 (2003).
  39. Kendall, E. A. *et al.* Development of immunoglobulin M memory to both a T-cell-independent and a T-cell-dependent antigen following infection with *Vibrio cholerae* O1 in Bangladesh. *Infect. Immun.* **78**, 253–259 (2010).
  40. Jourdan, M. *et al.* Characterization of a Transitional Preplasmablast Population in the Process of Human B Cell to Plasma Cell Differentiation. *J. Immunol.* **187**, 3931–3941 (2011).
  41. 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. *Blood* **114**, 5173–5181 (2009).
  42. MI, C., Dr, G., A, T. & GI, G. Antibody Structure and Function: The Basis for Engineering Therapeutics. *Antibodies Basel Switz.* **8**, (2019).
  43. Hansel, T. T., Kropshofer, H., Singer, T., Mitchell, J. A. & George, A. J. T. The safety and side effects of monoclonal antibodies. *Nat. Rev. Drug Discov.* **9**, 325–338 (2010).
  44. Mr, E. & Ca, N. The importance of natural IgM: scavenger, protector and regulator. *Nat. Rev. Immunol.* **10**, (2010).
  45. Hw, S. & L, C. Structure and function of immunoglobulins. *J. Allergy Clin. Immunol.* **125**, (2010).
  46. Woof, J. M. & Russell, M. W. Structure and function relationships in IgA. *Mucosal Immunol.* **4**, 590–597 (2011).
  47. Li, Y., Jin, L. & Chen, T. The Effects of Secretory IgA in the Mucosal Immune System. *BioMed Res. Int.* **2020**, 2032057 (2020).
  48. Oettgen, H. C. Fifty years later: Emerging functions of IgE antibodies in host defense, immune regulation, and allergic diseases. *J. Allergy Clin. Immunol.* **137**, 1631–1645 (2016).
  49. Hoffman, W., Lakkis, F. G. & Chalasani, G. B Cells, Antibodies, and More. *Clin. J. Am. Soc. Nephrol. CJASN* **11**, 137–154 (2016).
  50. Li, R. *et al.* Antibody-Independent Function of Human B Cells Contributes to Antifungal T Cell Responses. *J. Immunol.* **198**, 3245–3254 (2017).
  51. Upasani, V., Rodenhuis-Zybert, I. & Cantaert, T. Antibody-independent functions of B cells

during viral infections. *PLOS Pathog.* **17**, e1009708 (2021).

52. Hong, S. *et al.* B Cells Are the Dominant Antigen-Presenting Cells that Activate Naive CD4+ T Cells upon Immunization with a Virus-Derived Nanoparticle Antigen. *Immunity* **49**, 695-708.e4 (2018).
53. Menard, L. C. *et al.* B cells amplify IFN-gamma production by T cells via a TNF-alpha-mediated mechanism. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 4857–4866 (2007).
54. Barr, T. A., Brown, S., Mastroeni, P. & Gray, D. TLR and BCR signals to B cells differentially programme primary and memory Th1 responses to Salmonella enterica. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **185**, 2783–2789 (2010).
55. Perdomo-Celis, F. *et al.* Identification and Characterization at the Single-Cell Level of Cytokine-Producing Circulating Cells in Children With Dengue. *J. Infect. Dis.* **217**, 1472–1480 (2018).
56. Bao, Y. *et al.* Identification of IFN- $\gamma$ -producing innate B cells. *Cell Res.* **24**, 161–176 (2014).
57. Hilgendorf, I. *et al.* Innate response activator B cells aggravate atherosclerosis by stimulating T helper-1 adaptive immunity. *Circulation* **129**, 1677–1687 (2014).
58. Wojciechowski, W. *et al.* Cytokine-producing effector B cells regulate type 2 immunity to H. polygyrus. *Immunity* **30**, 421–433 (2009).
59. Blair, P. A. *et al.* CD19(+)/CD24(hi)/CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients. *Immunity* **32**, 129–140 (2010).
60. Newell, K. A. *et al.* Identification of a B cell signature associated with renal transplant tolerance in humans. *J. Clin. Invest.* **120**, 1836–1847 (2010).
61. Kessel, A. *et al.* Human CD19+CD25high B regulatory cells suppress proliferation of CD4+ T cells and enhance Foxp3 and CTLA-4 expression in T-regulatory cells. *Autoimmun. Rev.* **11**, 670–677 (2012).
62. Flores-Borja, F. *et al.* CD19+CD24hiCD38hi B Cells Maintain Regulatory T Cells While Limiting TH1 and TH17 Differentiation. *Sci. Transl. Med.* (2013) doi:10.1126/scitranslmed.3005407.
63. Corsiero, E., Delvecchio, F. R., Bombardieri, M. & Pitzalis, C. B cells in the formation of tertiary lymphoid organs in autoimmunity, transplantation and tumorigenesis. *Curr. Opin. Immunol.* **57**, 46–52 (2019).
64. Humby, F. *et al.* Ectopic Lymphoid Structures Support Ongoing Production of Class-Switched Autoantibodies in Rheumatoid Synovium. *PLoS Med.* **6**, e1 (2009).
65. Bombardieri, M., Lewis, M. & Pitzalis, C. Ectopic lymphoid neogenesis in rheumatic autoimmune diseases. *Nat. Rev. Rheumatol.* **13**, 141–154 (2017).
66. Kaul, A. *et al.* Systemic lupus erythematosus. *Nat. Rev. Dis. Primer* **2**, 16039 (2016).
67. Jacobi, A. M. *et al.* HLA-DRhigh/CD27high plasmablasts indicate active disease in patients with systemic lupus erythematosus. *Ann. Rheum. Dis.* **69**, 305–308 (2010).
68. Jacobi, A. M. *et al.* Correlation between circulating CD27high plasma cells and disease activity in patients with systemic lupus erythematosus. *Arthritis Rheum.* **48**, 1332–1342 (2003).
69. Arkatkar, T. *et al.* B cell-derived IL-6 initiates spontaneous germinal center formation during systemic autoimmunity. *J. Exp. Med.* **214**, 3207–3217 (2017).
70. Heinemann, K. *et al.* Decreased IL-10(+) regulatory B cells (Bregs) in lupus nephritis patients. *Scand. J. Rheumatol.* **45**, 312–316 (2016).
71. Chang, A. *et al.* In situ B cell-mediated immune responses and tubulointerstitial inflammation in human lupus nephritis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **186**, 1849–1860 (2011).
72. Grassi, W., De Angelis, R., Lamanna, G. & Cervini, C. The clinical features of rheumatoid arthritis. *Eur. J. Radiol.* **27**, S18–S24 (1998).
73. van Delft, M. A. M. & Huizinga, T. W. J. An overview of autoantibodies in rheumatoid arthritis. *J. Autoimmun.* **110**, 102392 (2020).
74. Choi, S.-T. & Lee, K.-H. Clinical management of seronegative and seropositive rheumatoid arthritis: A comparative study. *PLOS ONE* **13**, e0195550 (2018).
75. O'Neill, S. K. *et al.* Antigen-Specific B Cells Are Required as APCs and Autoantibody-Producing Cells for Induction of Severe Autoimmune Arthritis. *J. Immunol.* **174**, 3781–3788 (2005).
76. Sun, W. *et al.* B cells inhibit bone formation in rheumatoid arthritis by suppressing osteoblast differentiation. *Nat. Commun.* **9**, 5127 (2018).
77. Bankó, Z. *et al.* Induction and Differentiation of IL-10-Producing Regulatory B Cells from

- Healthy Blood Donors and Rheumatoid Arthritis Patients. *J. Immunol.* **198**, 1512–1520 (2017).
78. Ma, L., Liu, B., Jiang, Z. & Jiang, Y. Reduced numbers of regulatory B cells are negatively correlated with disease activity in patients with new-onset rheumatoid arthritis. *Clin. Rheumatol.* **33**, 187–195 (2014).
  79. Hu, F. *et al.* Impaired CD27+IgD+ B Cells With Altered Gene Signature in Rheumatoid Arthritis. *Front. Immunol.* **9**, 626 (2018).
  80. Talley, C. L. The emergence of multiple sclerosis as a nosological category in France, 1838–1868. *J. Hist. Neurosci.* **12**, 250–265 (2003).
  81. Grzegorski, T. & Losy, J. Multiple sclerosis - the remarkable story of a baffling disease. *Rev. Neurosci.* **30**, 511–526 (2019).
  82. Kornek, B. & Lassmann, H. Axonal pathology in multiple sclerosis. A historical note. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **9**, 651–656 (1999).
  83. Cook, S. D. Multiple sclerosis. *Arch. Neurol.* **55**, 421–423 (1998).
  84. Kabat, E. A., Moore, D. H. & Landow, H. AN ELECTROPHORETIC STUDY OF THE PROTEIN COMPONENTS IN CEREBROSPINAL FLUID AND THEIR RELATIONSHIP TO THE SERUM PROTEINS 1. *J. Clin. Invest.* **21**, 571–577 (1942).
  85. Dendrou, C. A., Fugger, L. & Friese, M. A. Immunopathology of multiple sclerosis. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 545–558 (2015).
  86. Brownlee, W. J., Hardy, T. A., Fazekas, F. & Miller, D. H. Diagnosis of multiple sclerosis: progress and challenges. *Lancet Lond. Engl.* **389**, 1336–1346 (2017).
  87. Fisniku, L. K. *et al.* Disability and T2 MRI lesions: a 20-year follow-up of patients with relapse onset of multiple sclerosis. *Brain* **131**, 808–817 (2008).
  88. Thompson, A. J. *et al.* Diagnosis of multiple sclerosis: 2017 revisions of the McDonald criteria. *Lancet Neurol.* **17**, 162–173 (2018).
  89. Dobson, R., Ramagopalan, S., Davis, A. & Giovannoni, G. Cerebrospinal fluid oligoclonal bands in multiple sclerosis and clinically isolated syndromes: a meta-analysis of prevalence, prognosis and effect of latitude. *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* **84**, 909–914 (2013).
  90. Link, H. & Huang, Y.-M. Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: An update on methodology and clinical usefulness. *J. Neuroimmunol.* **180**, 17–28 (2006).
  91. Kurtzke, J. F. Rating neurologic impairment in multiple sclerosis: an expanded disability status scale (EDSS). *Neurology* **33**, 1444–1452 (1983).
  92. Harirchian, M. H., Fatehi, F., Sarraf, P., Honarvar, N. M. & Bitarafan, S. Worldwide prevalence of familial multiple sclerosis: A systematic review and meta-analysis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **20**, 43–47 (2018).
  93. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* **359**, 1221–1231 (2002).
  94. Patsopoulos, N. A. *et al.* Fine-mapping the genetic association of the major histocompatibility complex in multiple sclerosis: HLA and non-HLA effects. *PLoS Genet.* **9**, e1003926 (2013).
  95. Sawcer, S. *et al.* Genetic risk and a primary role for cell-mediated immune mechanisms in multiple sclerosis. *Nature* **476**, 214–219 (2011).
  96. International Multiple Sclerosis Genetics Consortium *et al.* Risk alleles for multiple sclerosis identified by a genomewide study. *N. Engl. J. Med.* **357**, 851–862 (2007).
  97. Compston, A. & Coles, A. Multiple sclerosis. *The Lancet* **372**, 1502–1517 (2008).
  98. Munger, K. L., Levin, L. I., Hollis, B. W., Howard, N. S. & Ascherio, A. Serum 25-hydroxyvitamin D levels and risk of multiple sclerosis. *JAMA* **296**, 2832–2838 (2006).
  99. Sandberg, L. *et al.* Vitamin D and axonal injury in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **22**, 1027–1031 (2016).
  100. Simpson, S. *et al.* Higher 25-hydroxyvitamin D is associated with lower relapse risk in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **68**, 193–203 (2010).
  101. Bäärnhielm, M., Olsson, T. & Alfredsson, L. Fatty fish intake is associated with decreased occurrence of multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **20**, 726–732 (2014).
  102. Olsson, T., Barcellos, L. F. & Alfredsson, L. Interactions between genetic, lifestyle and environmental risk factors for multiple sclerosis. *Nat. Rev. Neurol.* **13**, 25–36 (2017).
  103. Handel, A. E. *et al.* An Updated Meta-Analysis of Risk of Multiple Sclerosis following Infectious Mononucleosis. *PLoS ONE* **5**, e12496 (2010).
  104. Gieß, R. M. *et al.* Epstein-Barr virus antibodies in serum and DNA load in saliva are not

- associated with radiological or clinical disease activity in patients with early multiple sclerosis. *PLOS ONE* **12**, e0175279 (2017).
105. Levin, L. I., Munger, K. L., O'Reilly, E. J., Falk, K. I. & Ascherio, A. Primary Infection with the Epstein-Barr Virus and Risk of Multiple Sclerosis. *Ann. Neurol.* **67**, 824–830 (2010).
  106. Farrell, R. A. *et al.* Humoral immune response to EBV in multiple sclerosis is associated with disease activity on MRI. *Neurology* **73**, 32–38 (2009).
  107. Nociti, V. *et al.* Epstein-Barr virus antibodies in serum and cerebrospinal fluid from multiple sclerosis, chronic inflammatory demyelinating polyradiculoneuropathy and amyotrophic lateral sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **225**, 149–152 (2010).
  108. 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).
  109. Magliozzi, R. *et al.* B-cell enrichment and Epstein-Barr virus infection in inflammatory cortical lesions in secondary progressive multiple sclerosis. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **72**, 29–41 (2013).
  110. 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. *J. Exp. Med.* **205**, 1763–1773 (2008).
  111. Li, R. *et al.* Cytokine-Defined B Cell Responses as Therapeutic Targets in Multiple Sclerosis. *Front. Immunol.* **6**, 626 (2015).
  112. D'Addario, M., Libermann, T. A., Xu, J., Ahmad, A. & Menezes, J. Epstein-Barr Virus and its glycoprotein-350 upregulate IL-6 in human B-lymphocytes via CD21, involving activation of NF-kappaB and different signaling pathways. *J. Mol. Biol.* **308**, 501–514 (2001).
  113. Bjornevik, K. *et al.* Longitudinal analysis reveals high prevalence of Epstein-Barr virus associated with multiple sclerosis. *Science* (2022) doi:10.1126/science.abj8222.
  114. Lanz, T. V. *et al.* Clonally Expanded B Cells in Multiple Sclerosis Bind EBV EBNA1 and GlialCAM. *Nature* 1–12 (2022) doi:10.1038/s41586-022-04432-7.
  115. Cohen, J. I. Epstein-Barr virus infection. *N. Engl. J. Med.* **343**, 481–492 (2000).
  116. Sundström, P., Nyström, M., Ruuth, K. & Lundgren, E. Antibodies to specific EBNA-1 domains and HLA DRB1\*1501 interact as risk factors for multiple sclerosis. *J. Neuroimmunol.* **215**, 102–107 (2009).
  117. Sundqvist, E. *et al.* Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: interaction with HLA. *Genes Immun.* **13**, 14–20 (2012).
  118. Hauser, S. L. & Cree, B. A. C. Treatment of Multiple Sclerosis: A Review. *Am. J. Med.* **133**, 1380-1390.e2 (2020).
  119. Thompson, A. J., Baranzini, S. E., Geurts, J., Hemmer, B. & Ciccarelli, O. Multiple sclerosis. *Lancet Lond. Engl.* **391**, 1622–1636 (2018).
  120. Filippi, M. *et al.* Multiple sclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primer* **4**, 43 (2018).
  121. Polman, C. H. *et al.* A randomized, placebo-controlled trial of natalizumab for relapsing multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **354**, 899–910 (2006).
  122. Gold, R., Linington, C. & Lassmann, H. Understanding pathogenesis and therapy of multiple sclerosis via animal models: 70 years of merits and culprits in experimental autoimmune encephalomyelitis research. *Brain J. Neurol.* **129**, 1953–1971 (2006).
  123. Glatigny, S. & Bettelli, E. Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE) as Animal Models of Multiple Sclerosis (MS). *Cold Spring Harb. Perspect. Med.* **8**, a028977 (2018).
  124. Litzenburger, T. *et al.* B lymphocytes producing demyelinating autoantibodies: development and function in gene-targeted transgenic mice. *J. Exp. Med.* **188**, 169–180 (1998).
  125. Pöllinger, B. *et al.* Spontaneous relapsing-remitting EAE in the SJL/J mouse: MOG-reactive transgenic T cells recruit endogenous MOG-specific B cells. *J. Exp. Med.* **206**, 1303–1316 (2009).
  126. Charabati, M., Rabanel, J.-M., Ramassamy, C. & Prat, A. Overcoming the Brain Barriers: From Immune Cells to Nanoparticles. *Trends Pharmacol. Sci.* **41**, 42–54 (2020).
  127. Furtado, D. *et al.* Overcoming the Blood–Brain Barrier: The Role of Nanomaterials in Treating Neurological Diseases. *Adv. Mater.* **30**, 1801362 (2018).
  128. Prinz, M. & Priller, J. The role of peripheral immune cells in the CNS in steady state and disease. *Nat. Neurosci.* **20**, 136–144 (2017).
  129. Daneman, R. & Prat, A. The Blood–Brain Barrier. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* **7**, a020412 (2015).



130. Mastorakos, P. & McGavern, D. The anatomy and immunology of vasculature in the central nervous system. *Sci. Immunol.* **4**, eaav0492 (2019).
131. Ortiz, G. G. *et al.* Role of the blood-brain barrier in multiple sclerosis. *Arch. Med. Res.* **45**, 687–697 (2014).
132. Michel, L. *et al.* Activated leukocyte cell adhesion molecule regulates B lymphocyte migration across central nervous system barriers. *Sci. Transl. Med.* **11**, eaaw0475 (2019).
133. Meeker, R. B., Williams, K., Killebrew, D. A. & Hudson, L. C. Cell trafficking through the choroid plexus. *Cell Adhes. Migr.* **6**, 390–396 (2012).
134. Kivisäkk, P. *et al.* Human cerebrospinal fluid central memory CD4<sup>+</sup> T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **100**, 8389–8394 (2003).
135. 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. *Nat. Immunol.* **10**, 514–523 (2009).
136. Frischer, J. M. *et al.* Clinical and Pathological Insights into the Dynamic Nature of the White Matter Multiple Sclerosis Plaque. *Ann. Neurol.* **78**, 710–721 (2015).
137. Gaitán, M. I. *et al.* Evolution of the Blood-Brain Barrier in Newly Forming Multiple Sclerosis Lesions. *Ann. Neurol.* **70**, 22–29 (2011).
138. Frohman, E. M., Racke, M. K. & Raine, C. S. Multiple sclerosis--the plaque and its pathogenesis. *N. Engl. J. Med.* **354**, 942–955 (2006).
139. Vogel, D. Y. *et al.* Macrophages in inflammatory multiple sclerosis lesions have an intermediate activation status. *J. Neuroinflammation* **10**, 809 (2013).
140. Serafini, B. *et al.* Dendritic Cells in Multiple Sclerosis Lesions: Maturation Stage, Myelin Uptake, and Interaction With Proliferating T Cells. *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* **65**, 124–141 (2006).
141. 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).
142. Davalos, D. *et al.* Fibrinogen-induced perivascular microglial clustering is required for the development of axonal damage in neuroinflammation. *Nat. Commun.* **3**, 1227 (2012).
143. Wang, J. *et al.* Targeting Microglia and Macrophages: A Potential Treatment Strategy for Multiple Sclerosis. *Front. Pharmacol.* **10**, 286 (2019).
144. Miron, V. E. *et al.* M2 microglia and macrophages drive oligodendrocyte differentiation during CNS remyelination. *Nat. Neurosci.* **16**, 1211–1218 (2013).
145. Lampron, A. *et al.* Inefficient clearance of myelin debris by microglia impairs remyelinating processes. *J. Exp. Med.* **212**, 481–495 (2015).
146. Yamasaki, R. *et al.* Differential roles of microglia and monocytes in the inflamed central nervous system. *J. Exp. Med.* **211**, 1533–1549 (2014).
147. Valentin-Torres, A. *et al.* Sustained TNF production by central nervous system infiltrating macrophages promotes progressive autoimmune encephalomyelitis. *J. Neuroinflammation* **13**, 46 (2016).
148. Natrajan, M. S. *et al.* Retinoid X receptor activation reverses age-related deficiencies in myelin debris phagocytosis and remyelination. *Brain* **138**, 3581–3597 (2015).
149. 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. *J. Exp. Med.* **205**, 1535–1541 (2008).
150. Becher, B., Durell, B. G. & Noelle, R. J. Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12. *J. Clin. Invest.* **110**, 493–497 (2002).
151. 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).
152. 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. *J. Exp. Med.* **203**, 1685–1691 (2006).
153. Ferber, I. A. *et al.* Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE). *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **156**, 5–7 (1996).
154. 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. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **179**, 8098–8104 (2007).

155. Haak, S. *et al.* IL-17A and IL-17F do not contribute vitally to autoimmune neuro-inflammation in mice. *J. Clin. Invest.* **119**, 61–69 (2009).
156. Sonderegger, I., Kisielow, J., Meier, R., King, C. & Kopf, M. IL-21 and IL-21R are not required for development of Th17 cells and autoimmunity in vivo. *Eur. J. Immunol.* **38**, 1833–1838 (2008).
157. Abromson-Leeman, S., Bronson, R. T. & Dorf, M. E. Encephalitogenic T cells that stably express both T-bet and ROR gamma t consistently produce IFN $\gamma$  but have a spectrum of IL-17 profiles. *J. Neuroimmunol.* **215**, 10–24 (2009).
158. Shiomi, A. & Usui, T. Pivotal Roles of GM-CSF in Autoimmunity and Inflammation. *Mediators Inflamm.* **2015**, e568543 (2015).
159. Codarri, L. *et al.* ROR $\gamma$ t drives production of the cytokine GM-CSF in helper T cells, which is essential for the effector phase of autoimmune neuroinflammation. *Nat. Immunol.* **12**, 560–567 (2011).
160. El-Behi, M. *et al.* The encephalitogenicity of T(H)17 cells is dependent on IL-1- and IL-23-induced production of the cytokine GM-CSF. *Nat. Immunol.* **12**, 568–575 (2011).
161. Brucklacher-Waldert, V., Stürner, K., Kolster, M., Wolthausen, J. & Tolosa, E. Phenotypical and functional characterization of T helper 17 cells in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* **132**, 3329–3341 (2009).
162. Lock, C. *et al.* Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis. *Nat. Med.* **8**, 500–508 (2002).
163. Kebir, H. *et al.* Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing TH17 cells in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **66**, 390–402 (2009).
164. van Langelaar, J. *et al.* T helper 17.1 cells associate with multiple sclerosis disease activity: perspectives for early intervention. *Brain J. Neurol.* **141**, 1334–1349 (2018).
165. Hellings, N. *et al.* T-cell reactivity to multiple myelin antigens in multiple sclerosis patients and healthy controls. *J. Neurosci. Res.* **63**, 290–302 (2001).
166. Cao, Y. *et al.* Distinct Inflammatory Profiles of Myelin-Reactive T cells from Patients with Multiple Sclerosis. *Sci. Transl. Med.* **7**, 287ra74 (2015).
167. Cao, Y. *et al.* Functional inflammatory profiles distinguish myelin-reactive T cells from patients with multiple sclerosis. *Sci. Transl. Med.* **7**, 287ra74 (2015).
168. Frischer, J. M. *et al.* The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains. *Brain* **132**, 1175–1189 (2009).
169. Babbe, H. *et al.* Clonal expansions of CD8(+) T cells dominate the T cell infiltrate in active multiple sclerosis lesions as shown by micromanipulation and single cell polymerase chain reaction. *J. Exp. Med.* **192**, 393–404 (2000).
170. Höftberger, R. *et al.* Expression of major histocompatibility complex class I molecules on the different cell types in multiple sclerosis lesions. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **14**, 43–50 (2004).
171. 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. *Am. J. Pathol.* **172**, 146–155 (2008).
172. Afzal, R., Dowling, J. K. & McCoy, C. E. Impact of Exercise on Immunometabolism in Multiple Sclerosis. *J. Clin. Med.* **9**, E3038 (2020).
173. Haas, J. *et al.* B cells undergo unique compartmentalized redistribution in multiple sclerosis. *J. Autoimmun.* **37**, 289–299 (2011).
174. Holmøy, T. The Discovery of Oligoclonal Bands: A 50-Year Anniversary. *Eur. Neurol.* **62**, 311–315 (2009).
175. Villar, L. M. *et al.* Intrathecal IgM synthesis in neurologic diseases: relationship with disability in MS. *Neurology* **58**, 824–826 (2002).
176. Villar, L. M. *et al.* Intrathecal IgM synthesis is a prognostic factor in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **53**, 222–226 (2003).
177. Villar, L. M. *et al.* Intrathecal synthesis of oligoclonal IgM against myelin lipids predicts an aggressive disease course in MS. *J. Clin. Invest.* **115**, 187–194 (2005).
178. Brändle, S. M. *et al.* Distinct oligoclonal band antibodies in multiple sclerosis recognize ubiquitous self-proteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **113**, 7864–7869 (2016).
179. Genain, C. P., Cannella, B., Hauser, S. L. & Raine, C. S. Identification of autoantibodies associated with myelin damage in multiple sclerosis. *Nat. Med.* **5**, 170–175 (1999).
180. Blauth, K. *et al.* Antibodies produced by clonally expanded plasma cells in multiple sclerosis cerebrospinal fluid cause demyelination of spinal cord explants. *Acta Neuropathol. (Berl.)* **130**, 765–

781 (2015).

181. Elliott, C. *et al.* Functional identification of pathogenic autoantibody responses in patients with multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* **135**, 1819–1833 (2012).
182. Sabatino, J. J., Pröbstel, A.-K. & Zamvil, S. S. B cells in autoimmune and neurodegenerative central nervous system diseases. *Nat. Rev. Neurosci.* **20**, 728–745 (2019).
183. 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).
184. Kuhle, J. *et al.* Lack of association between antimyelin antibodies and progression to multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **356**, 371–378 (2007).
185. Srivastava, R. *et al.* Potassium Channel KIR4.1 as an Immune Target in Multiple Sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **367**, 115–123 (2012).
186. Nerrant, E. *et al.* Lack of confirmation of anti-inward rectifying potassium channel 4.1 antibodies as reliable markers of multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **20**, 1699–1703 (2014).
187. Waters, P. J. *et al.* Serologic diagnosis of NMO: a multicenter comparison of aquaporin-4-IgG assays. *Neurology* **78**, 665–671; discussion 669 (2012).
188. 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).
189. Bar-Or, A. *et al.* Rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a 72-week, open-label, phase I trial. *Ann. Neurol.* **63**, 395–400 (2008).
190. Hauser, S. L. *et al.* B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **358**, 676–688 (2008).
191. Tipton, T. R. W. *et al.* Antigenic modulation limits the effector cell mechanisms employed by type I anti-CD20 monoclonal antibodies. *Blood* **125**, 1901–1909 (2015).
192. Beers, S. A., Chan, C. H. T., French, R. R., Cragg, M. S. & Glennie, M. J. CD20 as a target for therapeutic type I and II monoclonal antibodies. *Semin. Hematol.* **47**, 107–114 (2010).
193. Kappos, L. *et al.* Ocrelizumab in relapsing-remitting multiple sclerosis: a phase 2, randomised, placebo-controlled, multicentre trial. *Lancet Lond. Engl.* **378**, 1779–1787 (2011).
194. Rodríguez-Pinto, D. B cells as antigen presenting cells. *Cell. Immunol.* **238**, 67–75 (2005).
195. Rivera, A., Chen, C. C., Ron, N., Dougherty, J. P. & Ron, Y. Role of B cells as antigen-presenting cells in vivo revisited: antigen-specific B cells are essential for T cell expansion in lymph nodes and for systemic T cell responses to low antigen concentrations. *Int. Immunol.* **13**, 1583–1593 (2001).
196. Milich, D. R. *et al.* Role of B cells in antigen presentation of the hepatitis B core. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **94**, 14648–14653 (1997).
197. Li, R. *et al.* Antibody-Independent Function of Human B Cells Contributes to Antifungal T Cell Responses. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **198**, 3245–3254 (2017).
198. Serreze, D. V. *et al.* B lymphocytes are critical antigen-presenting cells for the initiation of T cell-mediated autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **161**, 3912–3918 (1998).
199. Weber, M. S. *et al.* B-cell activation influences T-cell polarization and outcome of anti-CD20 B-cell depletion in central nervous system autoimmunity. *Ann. Neurol.* **68**, 369–383 (2010).
200. Molnarfi, N. *et al.* MHC class II-dependent B cell APC function is required for induction of CNS autoimmunity independent of myelin-specific antibodies. *J. Exp. Med.* **210**, 2921–2937 (2013).
201. Aung, L. L. & Balashov, K. E. Decreased Dicer expression is linked to increased expression of co-stimulatory molecule CD80 on B cells in Multiple Sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **21**, 1131–1138 (2015).
202. Genç, K., Dona, D. L. & Reder, A. T. Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy. *J. Clin. Invest.* **99**, 2664–2671 (1997).
203. Mathias, A. *et al.* Increased ex vivo antigen presentation profile of B cells in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Houndmills Basingstoke Engl.* **23**, 802–809 (2017).
204. Harp, C. T. *et al.* Memory B cells from a subset of treatment naïve relapsing remitting multiple sclerosis patients elicit CD4+ T cell proliferation and IFN- $\gamma$  production in response to MBP and MOG. *Eur. J. Immunol.* **40**, 2942–2956 (2010).

205. Shen, P. & Fillatreau, S. Antibody-independent functions of B cells: a focus on cytokines. *Nat. Rev. Immunol.* **15**, 441–451 (2015).
206. Bar-Or, A. *et al.* Abnormal B-cell cytokine responses a trigger of T-cell-mediated disease in MS? *Ann. Neurol.* **67**, 452–461 (2010).
207. Barr, T. A. *et al.* B cell depletion therapy ameliorates autoimmune disease through ablation of IL-6-producing B cells. *J. Exp. Med.* **209**, 1001–1010 (2012).
208. Li, R. *et al.* Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci. Transl. Med.* **7**, 310ra166 (2015).
209. Duddy, M. *et al.* Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **178**, 6092–6099 (2007).
210. Fillatreau, S., Sweenie, C. H., McGeachy, M. J., Gray, D. & Anderton, S. M. B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10. *Nat. Immunol.* **3**, 944–950 (2002).
211. Yoshizaki, A. *et al.* Regulatory B cells control T-cell autoimmunity through IL-21-dependent cognate interactions. *Nature* **491**, 264–268 (2012).
212. Bjarnadóttir, K. *et al.* B cell-derived transforming growth factor- $\beta$ 1 expression limits the induction phase of autoimmune neuroinflammation. *Sci. Rep.* **6**, 34594 (2016).
213. Wang, R.-X. *et al.* Interleukin-35 induces regulatory B cells that suppress autoimmune disease. *Nat. Med.* **20**, 633–641 (2014).
214. Shen, P. *et al.* IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature* **507**, 366–370 (2014).
215. Kappos, L. *et al.* Atacicept in multiple sclerosis (ATAMS): a randomised, placebo-controlled, double-blind, phase 2 trial. *Lancet Neurol.* **13**, 353–363 (2014).
216. Machado-Santos, J. *et al.* The compartmentalized inflammatory response in the multiple sclerosis brain is composed of tissue-resident CD8+ T lymphocytes and B cells. *Brain* **141**, 2066–2082 (2018).
217. Rojas, O. L. *et al.* Recirculating Intestinal IgA-Producing Cells Regulate Neuroinflammation via IL-10. *Cell* **176**, 610-624.e18 (2019).
218. Pröbstel, A.-K. *et al.* Gut microbiota-specific IgA+ B cells traffic to the CNS in active multiple sclerosis. *Sci. Immunol.* **5**, eabc7191 (2020).
219. Kutzelnigg, A. *et al.* Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* **128**, 2705–2712 (2005).
220. Magliozzi, R. *et al.* Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain J. Neurol.* **130**, 1089–1104 (2007).
221. Goldschmidt, T., Antel, J., König, F. B., Brück, W. & Kuhlmann, T. Remyelination capacity of the MS brain decreases with disease chronicity. *Neurology* **72**, 1914–1921 (2009).
222. Serafini, B., Rosicarelli, B., Magliozzi, R., Stigliano, E. & Aloisi, F. Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis. *Brain Pathol. Zurich Switz.* **14**, 164–174 (2004).
223. Magliozzi, R. *et al.* A Gradient of neuronal loss and meningeal inflammation in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **68**, 477–493 (2010).
224. Magliozzi, R. *et al.* Inflammatory intrathecal profiles and cortical damage in multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **83**, 739–755 (2018).
225. Bevan, R. J. *et al.* Meningeal inflammation and cortical demyelination in acute multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **84**, 829–842 (2018).
226. Lucchinetti, C. F. *et al.* Inflammatory cortical demyelination in early multiple sclerosis. *N. Engl. J. Med.* **365**, 2188–2197 (2011).
227. Magliozzi, R. *et al.* The CSF Profile Linked to Cortical Damage Predicts Multiple Sclerosis Activity. *Ann. Neurol.* **88**, 562–573 (2020).
228. Choi, S. R. *et al.* Meningeal inflammation plays a role in the pathology of primary progressive multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* **135**, 2925–2937 (2012).
229. Villar, L. M. *et al.* Immunoglobulin M oligoclonal bands: biomarker of targetable inflammation in primary progressive multiple sclerosis. *Ann. Neurol.* **76**, 231–240 (2014).
230. Piancone, F. *et al.* B Lymphocytes in Multiple Sclerosis: Bregs and BTLA/CD272 Expressing-CD19+ Lymphocytes Modulate Disease Severity. *Sci. Rep.* **6**, 29699 (2016).

231. Iwanowski, P., Losy, J., Kramer, L., Wójcicka, M. & Kaufman, E. CXCL10 and CXCL13 chemokines in patients with relapsing remitting and primary progressive multiple sclerosis. *J. Neurol. Sci.* **380**, 22–26 (2017).
232. Novakova, L. *et al.* NFL and CXCL13 may reveal disease activity in clinically and radiologically stable MS. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **46**, 102463 (2020).
233. Montalban, X. *et al.* Ocrelizumab versus Placebo in Primary Progressive Multiple Sclerosis. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1606468> <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1606468> (2016) doi:10.1056/NEJMoa1606468.
234. Li, R., Patterson, K. R. & Bar-Or, A. Reassessing B cell contributions in multiple sclerosis. *Nat. Immunol.* **19**, 696–707 (2018).
235. Lisak, R. P. *et al.* Secretory products of multiple sclerosis B cells are cytotoxic to oligodendroglia in vitro. *J. Neuroimmunol.* **246**, 85–95 (2012).
236. Lisak, R. P. *et al.* B cells from patients with multiple sclerosis induce cell death via apoptosis in neurons in vitro. *J. Neuroimmunol.* **309**, 88–99 (2017).
237. 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).
238. Ueno, H., Banchereau, J. & Vinuesa, C. G. Pathophysiology of T follicular helper cells in humans and mice. *Nat. Immunol.* **16**, 142–152 (2015).
239. Harrer, C. *et al.* The CXCL13/CXCR5-chemokine axis in neuroinflammation: evidence of CXCR5+CD4 T cell recruitment to CSF. *Fluids Barriers CNS* **18**, 40 (2021).
240. Tzartos, J. S. *et al.* IL-21 and IL-21 receptor expression in lymphocytes and neurons in multiple sclerosis brain. *Am. J. Pathol.* **178**, 794–802 (2011).
241. Schafflick, D. *et al.* Integrated single cell analysis of blood and cerebrospinal fluid leukocytes in multiple sclerosis. *Nat. Commun.* **11**, 247 (2020).
242. Romme Christensen, J. *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).
243. Thursby, E. & Juge, N. Introduction to the human gut microbiota. *Biochem. J.* **474**, 1823–1836 (2017).
244. Li, J. *et al.* An integrated catalog of reference genes in the human gut microbiome. *Nat. Biotechnol.* **32**, 834–841 (2014).
245. Schroeder, B. O. & Bäckhed, F. Signals from the gut microbiota to distant organs in physiology and disease. *Nat. Med.* **22**, 1079–1089 (2016).
246. Morais, L. H., Schreiber, H. L. & Mazmanian, S. K. The gut microbiota–brain axis in behaviour and brain disorders. *Nat. Rev. Microbiol.* **19**, 241–255 (2021).
247. Cryan, J. F., O’Riordan, K. J., Sandhu, K., Peterson, V. & Dinan, T. G. The gut microbiome in neurological disorders. *Lancet Neurol.* **19**, 179–194 (2020).
248. Burgueño, J. F. & Abreu, M. T. Epithelial Toll-like receptors and their role in gut homeostasis and disease. *Nat. Rev. Gastroenterol. Hepatol.* **17**, 263–278 (2020).
249. Shi, N., Li, N., Duan, X. & Niu, H. Interaction between the gut microbiome and mucosal immune system. *Mil. Med. Res.* **4**, 14 (2017).
250. Mörbe, U. M. *et al.* Human gut-associated lymphoid tissues (GALT); diversity, structure, and function. *Mucosal Immunol.* **14**, 793–802 (2021).
251. Kamada, N., Seo, S.-U., Chen, G. Y. & Núñez, G. Role of the gut microbiota in immunity and inflammatory disease. *Nat. Rev. Immunol.* **13**, 321–335 (2013).
252. Atarashi, K. *et al.* ATP drives lamina propria TH17 cell differentiation. *Nature* **455**, 808–812 (2008).
253. 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).
254. Chung, H. *et al.* Gut Immune Maturation Depends on Colonization with a Host-Specific Microbiota. *Cell* **149**, 1578–1593 (2012).
255. 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).
256. Ivanov, I. I. *et al.* Induction of intestinal Th17 cells by segmented filamentous bacteria. *Cell* **139**, 485–498 (2009).

257. Shaw, M. H., Kamada, N., Kim, Y.-G. & Núñez, G. Microbiota-induced IL-1 $\beta$ , but not IL-6, is critical for the development of steady-state TH17 cells in the intestine. *J. Exp. Med.* **209**, 251–258 (2012).
258. Denning, T. L., Kim, G. & Kronenberg, M. Cutting Edge: CD4+CD25+ Regulatory T Cells Impaired for Intestinal Homing Can Prevent Colitis. *J. Immunol.* **174**, 7487–7491 (2005).
259. Atarashi, K. *et al.* Induction of colonic regulatory T cells by indigenous Clostridium species. *Science* **331**, 337–341 (2011).
260. Geuking, M. B. *et al.* Intestinal bacterial colonization induces mutualistic regulatory T cell responses. *Immunity* **34**, 794–806 (2011).
261. 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).
262. Coombes, J. L. *et al.* A functionally specialized population of mucosal CD103+ DCs induces Foxp3+ regulatory T cells via a TGF-beta and retinoic acid-dependent mechanism. *J. Exp. Med.* **204**, 1757–1764 (2007).
263. Fagarasan, S., Kawamoto, S., Kanagawa, O. & Suzuki, K. Adaptive immune regulation in the gut: T cell-dependent and T cell-independent IgA synthesis. *Annu. Rev. Immunol.* **28**, 243–273 (2010).
264. Mora, J. R. *et al.* Generation of gut-homing IgA-secreting B cells by intestinal dendritic cells. *Science* **314**, 1157–1160 (2006).
265. Tezuka, H. *et al.* Regulation of IgA production by naturally occurring TNF/iNOS-producing dendritic cells. *Nature* **448**, 929–933 (2007).
266. Strugnell, R. A. & Wijkburg, O. L. C. The role of secretory antibodies in infection immunity. *Nat. Rev. Microbiol.* **8**, 656–667 (2010).
267. Singh, K., Chang, C. & Gershwin, M. E. IgA deficiency and autoimmunity. *Autoimmun. Rev.* **13**, 163–177 (2014).
268. Fagarasan, S. *et al.* Critical Roles of Activation-Induced Cytidine Deaminase in the Homeostasis of Gut Flora. *Science* (2002) doi:10.1126/science.1077336.
269. Wei, M. *et al.* Mice carrying a knock-in mutation of Aicda resulting in a defect in somatic hypermutation have impaired gut homeostasis and compromised mucosal defense. *Nat. Immunol.* **12**, 264–270 (2011).
270. Uribe-Herranz, M., Klein-González, N., Rodríguez-Lobato, L. G., Juan, M. & de Larrea, C. F. Gut Microbiota Influence in Hematological Malignancies: From Genesis to Cure. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 1026 (2021).
271. Gorfou, G., Rivera-Nieves, J. & Ley, K. Role of  $\beta$ 7 integrins in intestinal lymphocyte homing and retention. *Curr. Mol. Med.* **9**, 836–850 (2009).
272. Johansson-Lindbom, B. & Agace, W. W. Generation of gut-homing T cells and their localization to the small intestinal mucosa. *Immunol. Rev.* **215**, 226–242 (2007).
273. Iwata, M. *et al.* Retinoic acid imprints gut-homing specificity on T cells. *Immunity* **21**, 527–538 (2004).
274. Stagg, A. J., Kamm, M. A. & Knight, S. C. Intestinal dendritic cells increase T cell expression of  $\alpha$ 4 $\beta$ 7 integrin. *Eur. J. Immunol.* **32**, 1445–1454 (2002).
275. Siewert, C. *et al.* Induction of organ-selective CD4+ regulatory T cell homing. *Eur. J. Immunol.* **37**, 978–989 (2007).
276. Johansson-Lindbom, B. *et al.* Selective Generation of Gut Tropic T Cells in Gut-associated Lymphoid Tissue (GALT). *J. Exp. Med.* **198**, 963–969 (2003).
277. Wagner, N. *et al.* Critical role for beta7 integrins in formation of the gut-associated lymphoid tissue. *Nature* **382**, 366–370 (1996).
278. Dzutsev, A. *et al.* Differential T cell homing to colon vs. small intestine is imprinted by local CD11c+ APCs that determine homing receptors. *J. Leukoc. Biol.* **102**, 1381–1388 (2017).
279. Kilshaw, P. J. & Murant, S. J. Expression and regulation of  $\beta$ 7( $\beta$ p) integrins on mouse lymphocytes: Relevance to the mucosal immune system. *Eur. J. Immunol.* **21**, 2591–2597 (1991).
280. Adams, D. H. & Eksteen, B. Aberrant homing of mucosal T cells and extra-intestinal manifestations of inflammatory bowel disease. *Nat. Rev. Immunol.* **6**, 244–251 (2006).
281. Kim, S. V. *et al.* GPR15-mediated homing controls immune homeostasis in the large intestine mucosa. *Science* **340**, 1456–1459 (2013).
282. Pitt, J. M. *et al.* Resistance Mechanisms to Immune-Checkpoint Blockade in Cancer: Tumor-

- Intrinsic and -Extrinsic Factors. *Immunity* **44**, 1255–1269 (2016).
283. Routy, B. *et al.* Gut microbiome influences efficacy of PD-1-based immunotherapy against epithelial tumors. *Science* **359**, 91–97 (2018).
284. Matson, V. *et al.* The commensal microbiome is associated with anti-PD-1 efficacy in metastatic melanoma patients. *Science* **359**, 104–108 (2018).
285. Seksik, P. *et al.* Alterations of the dominant faecal bacterial groups in patients with Crohn's disease of the colon. *Gut* **52**, 237–242 (2003).
286. Gophna, U., Sommerfeld, K., Gophna, S., Doolittle, W. F. & Veldhuyzen van Zanten, S. J. O. Differences between Tissue-Associated Intestinal Microfloras of Patients with Crohn's Disease and Ulcerative Colitis. *J. Clin. Microbiol.* **44**, 4136–4141 (2006).
287. Briskin, M. *et al.* Human mucosal addressin cell adhesion molecule-1 is preferentially expressed in intestinal tract and associated lymphoid tissue. *Am. J. Pathol.* **151**, 97–110 (1997).
288. Arihiro, S. *et al.* Differential expression of mucosal addressin cell adhesion molecule-1 (MAdCAM-1) in ulcerative colitis and Crohn's disease. *Pathol. Int.* **52**, 367–374 (2002).
289. Ghosh, S. *et al.* Natalizumab for active Crohn's disease. *N. Engl. J. Med.* **348**, 24–32 (2003).
290. Clifford, D. B. *et al.* Natalizumab-associated progressive multifocal leukoencephalopathy in patients with multiple sclerosis: lessons from 28 cases. *Lancet Neurol.* **9**, 438–446 (2010).
291. Sakuraba, A. *et al.* Natalizumab in Crohn's Disease: Results From a US Tertiary Inflammatory Bowel Disease Center. *Inflamm. Bowel Dis.* **19**, 621–626 (2013).
292. Sandborn, W. J. *et al.* Vedolizumab as Induction and Maintenance Therapy for Crohn's Disease. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1215739> <https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1215739> (2013) doi:10.1056/NEJMoa1215739.
293. Liu, X., Zou, Q., Zeng, B., Fang, Y. & Wei, H. Analysis of Fecal Lactobacillus Community Structure in Patients with Early Rheumatoid Arthritis. *Curr. Microbiol.* **67**, 170–176 (2013).
294. Maeda, Y. *et al.* Dysbiosis Contributes to Arthritis Development via Activation of Autoreactive T Cells in the Intestine. *Arthritis Rheumatol.* **68**, 2646–2661 (2016).
295. Wu, H.-J. *et al.* Gut-residing segmented filamentous bacteria drive autoimmune arthritis via T helper 17 cells. *Immunity* **32**, 815–827 (2010).
296. 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).
297. 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).
298. Lee, Y. K., Menezes, J. S., Umesaki, Y. & Mazmanian, S. K. Proinflammatory T-cell responses to gut microbiota promote experimental autoimmune encephalomyelitis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108 Suppl 1**, 4615–4622 (2011).
299. Ochoa-Repáraz, J. *et al.* Role of gut commensal microflora in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis. *J. Immunol. Baltim. Md 1950* **183**, 6041–6050 (2009).
300. Ochoa-Repáraz, J. *et al.* A polysaccharide from the human commensal *Bacteroides fragilis* protects against CNS demyelinating disease. *Mucosal Immunol.* **3**, 487–495 (2010).
301. Miyake, S. *et al.* Dysbiosis in the Gut Microbiota of Patients with Multiple Sclerosis, with a Striking Depletion of Species Belonging to Clostridia XIVa and IV Clusters. *PloS One* **10**, e0137429 (2015).
302. Chen, J. *et al.* Multiple sclerosis patients have a distinct gut microbiota compared to healthy controls. *Sci. Rep.* **6**, 28484 (2016).
303. Berer, K. *et al.* Gut microbiota from multiple sclerosis patients enables spontaneous autoimmune encephalomyelitis in mice. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **114**, 10719–10724 (2017).
304. 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).
305. Kadowaki, A., Saga, R., Lin, Y., Sato, W. & Yamamura, T. Gut microbiota-dependent CCR9+CD4<sup>+</sup> T cells are altered in secondary progressive multiple sclerosis. *Brain J. Neurol.* **142**, 916–931 (2019).
306. Haupteltshofer, S. *et al.* Smad7 in intestinal CD4<sup>+</sup> T cells determines autoimmunity in a spontaneous model of multiple sclerosis. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **116**, 25860–25869 (2019).
307. Pabst, O. & Slack, E. IgA and the intestinal microbiota: the importance of being specific.

- Mucosal Immunol.* **13**, 12–21 (2020).
308. Tang, C.-H. A. *et al.* STING regulates BCR signaling in normal and malignant B cells. *Cell. Mol. Immunol.* **18**, 1016–1031 (2021).
309. Gillis, C., Gouel-Chéron, A., Jönsson, F. & Bruhns, P. Contribution of Human Fc $\gamma$ Rs to Disease with Evidence from Human Polymorphisms and Transgenic Animal Studies. *Front. Immunol.* **5**, 254 (2014).
310. Durali, D. *et al.* In human B cells, IL-12 triggers a cascade of molecular events similar to Th1 commitment. *Blood* **102**, 4084–4089 (2003).
311. Yeramilli, V. A. & Knight, K. L. DEVELOPMENT OF CD27+ MARGINAL ZONE B CELLS REQUIRES GALT. *Eur. J. Immunol.* **43**, 1484–1488 (2013).
312. Palm, A.-K. E. & Kleinau, S. Marginal zone B cells: From housekeeping function to autoimmunity? *J. Autoimmun.* **119**, 102627 (2021).
313. Tull, T. J. *et al.* Human marginal zone B cell development from early T2 progenitors. *J. Exp. Med.* **218**, e20202001 (2021).
314. Guerrier, T. *et al.* Proinflammatory B-cell profile in the early phases of MS predicts an active disease. *Neurol. Neuroimmunol. Neuroinflammation* **5**, e431 (2017).
315. Magliozzi, R. *et al.* Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology. *Brain J. Neurol.* **130**, 1089–1104 (2007).
316. Jelcic, I. *et al.* Memory B Cells Activate Brain-Homing, Autoreactive CD4+ T Cells in Multiple Sclerosis. *Cell* **175**, 85–100.e23 (2018).
317. Lécuyer, E. *et al.* Segmented Filamentous Bacterium Uses Secondary and Tertiary Lymphoid Tissues to Induce Gut IgA and Specific T Helper 17 Cell Responses. *Immunity* **40**, 608–620 (2014).
318. Volpe, E. *et al.* A critical function for transforming growth factor-beta, interleukin 23 and proinflammatory cytokines in driving and modulating human T(H)-17 responses. *Nat. Immunol.* **9**, 650–657 (2008).
319. Lighaam, L. C. *et al.* In vitro-Induced Human IL-10+ B Cells Do Not Show a Subset-Defining Marker Signature and Plastically Co-express IL-10 With Pro-Inflammatory Cytokines. *Front. Immunol.* **9**, (2018).
320. Gros, M. J., Naquet, P. & Guinamard, R. R. Cell Intrinsic TGF- $\beta$ 1 Regulation of B Cells. *J. Immunol.* **180**, 8153–8158 (2008).
321. Li, R. *et al.* Proinflammatory GM-CSF-producing B cells in multiple sclerosis and B cell depletion therapy. *Sci. Transl. Med.* **7**, (2015).
322. Gommerman, J. L. & Browning, J. L. Lymphotoxin/LIGHT, lymphoid microenvironments and autoimmune disease. *Nat. Rev. Immunol.* **3**, 642–655 (2003).
323. Ueno, H. T follicular helper cells in human autoimmunity. *Curr. Opin. Immunol.* **43**, 24–31 (2016).
324. Krumbholz, M., Meinl, I., Kümpfel, T., Hohlfeld, R. & Meinl, E. Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis. *Neurology* **71**, 1350–1354 (2008).
325. Kemmerer, C. L. *et al.* Differential effects of disease modifying drugs on peripheral blood B cell subsets: A cross sectional study in multiple sclerosis patients treated with interferon- $\beta$ , glatiramer acetate, dimethyl fumarate, fingolimod or natalizumab. *PloS One* **15**, e0235449 (2020).
326. Cuculiza Henriksen, A. *et al.* Natalizumab differentially affects plasmablasts and B cells in multiple sclerosis. *Mult. Scler. Relat. Disord.* **52**, 102987 (2021).
327. Planas, R., Jelčić, I., Schippling, S., Martin, R. & Sospedra, M. Natalizumab treatment perturbs memory- and marginal zone-like B-cell homing in secondary lymphoid organs in multiple sclerosis. *Eur. J. Immunol.* **42**, 790–798 (2012).
328. Kowarik, M. C. *et al.* Differential Effects of Fingolimod and Natalizumab on B Cell Repertoires in Multiple Sclerosis Patients. *Neurother. J. Am. Soc. Exp. Neurother.* **18**, 364–377 (2021).