



Université Lille Nord de France
Pôle de Recherche
et d'Enseignement Supérieur

Université de Lille Nord de France

THÈSE délivrée par

L'UNIVERSITÉ Lille 2 – Droit et santé

Pour obtenir le grade de Docteur en Sciences de la Vie

Présentée et soutenue publiquement par

Catalina LEE CHANG

Le 8 décembre 2010

Étude de l'homéostasie lymphocytaire B dans la physiopathologie
de la sclérose en plaques : de l'approche expérimentale à l'Homme.

JURY

Pr. Lionel Prin

Président du jury

Pr. Frédéric Batteux

Rapporteur

Dr. José Boucraut

Rapporteur

Dr. David Laplaud

Examineur

Dr. Bénédicte Oxombre-Vanteghem

Examinatrice

Pr. Patrick Vermersch

Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Je tiens à remercier sincèrement le Professeur **Frédéric Batteux** et le Docteur **José Boucraut** d'avoir accepté d'être rapporteurs de cette thèse, ainsi que le Docteur **David Laplaud** en tant qu'examineur.

Je tiens à remercier tous les membres de l'EA 2686, et notamment :

Le Pr. **Lionel Prin**,

Vous me faites l'honneur de présider ce jury de thèse. Je vous remercie de m'avoir confié ce travail de thèse au sein de votre laboratoire il y a maintenant quatre ans. Merci de votre patience, de votre soutien et de vos encouragements tout au long de ce parcours, surtout dans les moments les plus difficiles. Grâce à l'opportunité que vous m'avez donnée, je sais aujourd'hui que mon avenir fait partie du monde infini de l'immunologie...Soyez assuré de ma profonde gratitude. Et surtout, vous m'avez appris LA règle principale : Ne jamais accorder après le verbe avoir ! (enfin...presque jamais !)

Le Pr. **Patrick Vermersch**,

Vous me faites l'honneur de codiriger cette thèse. Je vous remercie de votre confiance, de votre exigence et de vos encouragements à surmonter les périodes les plus critiques.

Le Pr. **Jean-Paul Dessaint**,

Je vous remercie de m'avoir accueillie au sein du laboratoire.

Bénédicte,

Tu me fais l'honneur de participer à mon jury de thèse. Merci pour ton amitié, si précieuse tout au long de cette thèse. Merci d'être restée à mes côtés dans les moments les plus difficiles, de m'avoir ouvert les portes de chez toi pour simplement me « changer les idées » ; d'avoir pleuré avec moi quand tout allait de travers (dans la plupart des cas, ce mécanisme est facilité par l'action d'un *adjuvant*...!!).

Didier, pour comprendre toujours le 4^{ème} degré de tout, pour partager le même humour. Tu as su m'écouter face à mes interminables doutes. Merci pour tes conseils, si importants pour moi.

Virginie, pour ton écoute, ta discrétion. Tu as su surmonter des épreuves très difficiles ces derniers temps, je t'admire.

Patricia, pour ta sensibilité, ta compagnie. Tu as toujours été disponible, pas seulement pour moi, mais pour tous les membres de cette équipe.

Jean-Emmanuel, mon colocataire de bureau, de galère et de thèse. Tu seras pour toujours mon 1^{er}-bis de derrière la porte ! (Tu me dois une photo !)

Isabelle, merci d'avoir partagé la même curiosité pour les lymphocytes B ! On a construit un projet qui, finalement, a donné ses fruits !

Hélène, pour tes encouragements, ta rigueur, ta ténacité et ta disponibilité.

Sylvain, merci d'avoir partagé tes connaissances en immunologie avec moi, avec la pédagogie qui te caractérise tant.

Fanny, pour ton amitié et ton écoute. Parler de science, de l'avenir avec toi est un grand plaisir !

Marianne et Amélie, mes anciennes colocataires de bureau. Merci pour votre bonne humeur et surtout d'être co-auteurs du Top 5 (en fait 4, mais aujourd'hui il n'en reste qu'un seul, vous savez qui ?).

Guillaume L, tu es arrivé en même temps que moi au laboratoire, et depuis tu n'as pas cessé de m'encourager.

Jacques, pour ta contribution au projet « exploration B », si précieuse. Tu as su m'aider, m'encourager, tu es un véritable chercheur!!

David B, mon deuxième colocataire de bureau. Merci d'avoir regretté comme moi le départ de Paul ; de rire à mes blagues parfois pas très drôles.

Emmanuelle, merci d'avoir « pris soin de moi », d'avoir trouvé la « juste dose ».

Un GRAND merci à vous tous !!! Vous m'avez appris que le Ch'Nord c'est chouette !!!
Merci pour avoir été patients avec moi, de m'avoir écoutée, d'avoir partagé ces moments si intenses avec moi. Je n'ai sûrement pas révolutionné la vie du laboratoire, mais vous avez révolutionné la mienne !

Je tiens aussi à remercier

Sylvie et Marie, merci de faire partie de notre vie quotidienne, de votre bonne humeur, de vos encouragements. Et surtout pour les meilleurs macarons du monde !

Christelle ; tu m'as ouvert les portes de ton laboratoire pour que je puisse « observer » mes lymphocytes B, il y a maintenant quatre ans. Un grand merci.

Tous les membres de **l'animalerie de l'Institut Pasteur de Lille**.

Je remercie **Bayer-Schering-Pharma** pour leur soutien et confiance.

Je ne pourrais écrire ces pages sans remercier tous les **patients et leurs familles** qui ont accepté de me donner « quelques lymphocytes B » pour faire avancer le projet. Un grand merci aussi à toutes les **infirmières, médecins et internes** du service de neurologie D pour avoir pensé à mon projet pendant toutes ces années.

Je souhaite aussi remercier toutes les personnes qui ont compté énormément tout au long de cette thèse,

Mes parents,

부모님께 진심으로 감사를 드립니다. 가장 힘든 시기에도 어떠한 편견과 의심도 없이 떨어져 있어도 항상 나의 결정을 존경해주셨고 나를 앞으로 나갈 수 있게끔 물심양면 힘 써주셨습니다. 이 길을 걸기로 한 순간부터 저에게 주신 지원 덕분에 오늘 이렇게 논문을 쓸수 있었습니다.

Mes sœurs,

A **Coty, Cynthia y Cecilia** ; por ser las mejores hermanas del mundo, por haberme “aguantado” durante todos estos años, por haberme cuidado cuando más lo necesitaba, y simplemente, por haber creído en mi desde el principio.

À **Ginette et Gilbert** ;

Pour votre soutien, vos encouragements et votre amour. Merci encore d’avoir toujours été à mes côtés, même à distance.

Mes amies,

A **Aïna, Alba, Carol y Celia**; por haber crecido conmigo, por haber compartido los momentos mas importantes de mi vida, y porque envejeceremos juntas (¡me vais a aguantar hasta mis 90 años!).

*Et finalement, à **Guillaume** ; pour ton soutien, ton écoute, tes encouragements. Merci de m’avoir accompagnée dans cette aventure, ça n’a pas été facile, et pour être prêt à continuer. Grâce à ton amour, à ta confiance en moi, à ton amitié inconditionnelle, j’écris aujourd’hui ces lignes. Je te dédie cette thèse.*

RÉSUMÉ

Auteur : Catalina Lee Chang

Titre : Étude de l'homéostasie lymphocytaire B dans la physiopathologie de la sclérose en plaques : de l'approche expérimentale à l'Homme.

Directeur de thèse : Professeur Patrick Vermersch

Lieu et date de soutenance : Lille, 8 décembre 2010

Résumé :

Dans un premier temps, l'utilisation d'un modèle murin de la sclérose en plaques (SEP) nous a permis de démontrer l'influence de l'homéostasie des lymphocytes B (LB) dans la physiopathologie de la réponse auto-immune. Ces observations ont été confirmées par des études réalisées chez l'Homme, dont la répartition des sous-populations des LB circulantes présente un déséquilibre homéostatique lors des premières phases de la maladie. En effet, nous avons observés que les LB transitionnels, aussi connus comme immatures tardifs, présentent des altérations du nombre cellulaire, de l'état d'activation et de l'expression de molécules d'adhésions impliquées dans le processus d'extravasation leucocytaire. Ces caractéristiques, spécifiques des LB transitionnels de patients SEP, ont été associées au recrutement de ces cellules au sein du système nerveux central. Ces résultats non conventionnels mettent en exergue que les LB mémoires ne sont pas les seules LB impliqués dans le développement de la SEP.

Mots clés : sclérose en plaques ; encéphalomyélite autoimmune expérimentale, lymphocyte B, barrière hémato-encéphalique, système nerveux central.

Discipline : Immunologie

TABLES DE MATIÈRES

RÉSUMÉ.....	5
TABLES DE MATIÈRES	6
PUBLICATIONS et COMMUNICATIONS	8
LISTE D'ABRÉVIATIONS	10
LISTE d'ILLUSTRATIONS et TABLES.....	12
INTRODUCTION.....	13
I. Homéostasie lymphocytaire B	14
I.A Implications des signaux BCR.....	14
I.A.1 Développement des lymphocytes B conventionnels ou B2	14
I.A.1.1. Développement central	14
I.A.1.2. Développement périphérique	16
I.A.2 Développement central et périphérique des lymphocytes B B1	21
I.B Implications d'autres signaux.....	22
I.B.1 BAFF/APRIL et leurs récepteurs dans le contrôle de l'homéostasie des cellules B	22
I.B.2 Les récepteurs de type Toll et l'homéostasie lymphocytaire B	25
II. Les relations entre le système immunitaire et le système nerveux central : Aspects physiologiques.....	27
II.A. La barrière hémato-encéphalique (BHE) et ses interfaces	27
II.A.1 L'interface sang-parenchyme cérébral	27
II.A.2 L'interface sang-liquide cérébrospinal	28
II.B L'immuno-surveillance du SNC	29
II.B.1 L'existence d'une communication entre le SNC et la circulation lymphatique par l'intermédiaire du LCS.....	29
II.B.2 L'existence d'un environnement immunologique au sein du SNC	29
II.C L'importance de l'immuno-surveillance du SNC.....	32
III. Les relations entre le système immunitaire et le système nerveux central : Aspects pathologiques - La sclérose en plaques	34
III.A. Aspects généraux de la sclérose en plaques	34
III.A.1 Aspects cliniques	34
III.A.2 Aspects génétiques et environnementaux.....	35
III.B L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale	36
III.B.1 Historique de l'EAE	37
III.B.2 Différents modèles d'EAE.....	39
III.C. L'immunologie de la SEP.....	41
III.C.1 Rôle de l'immunité innée	41
III.C.2. Rôle de l'immunité adaptative.....	44
II.C.2.1. Les lymphocytes T	44

II.C.2.2. Les lymphocytes B.....	46
III.D. Nouvelles approches thérapeutiques	50
IV. Les relations entre le système immunitaire et le système nerveux central : Régulation et réparation.....	52
IV. A. La réponse immune comme mécanisme régulateur	52
IV.A.1. Rôle de l'immunité innée	52
IV.A.2. Rôle de l'immunité adaptative	54
IV.A.2.1. Les lymphocytes T régulateurs	54
IV.A.2.2. Les lymphocytes B régulateurs	57
IV.B. La réponse immune comme mécanisme de réparation tissulaire.....	60
V. Objectifs du travail : Intérêt de l'étude de l'homéostasie lymphocytaire B	62
RÉSULTATS	64
I. L'homéostasie lymphocytaire B et l'EAE	64
I.A. Analyse séquentielle des sous-populations lymphocytaires B au cours de l'EAE ...	64
I.A.1. Article #1 : Susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with altered B-cell subsets distribution and decreased serum BAFF levels	66
I.B. Étude de l'expression d'IDO par les lymphocytes B spléniques murins	67
II. L'homéostasie lymphocytaire B et la SEP	71
II.A. Implication des lymphocytes B transitionnels au cours des phases précoces de la maladie	71
II.A.1. Article #2 : Primed status of transitional B cells associated with their ability to cross the blood-CSF barrier in early phases of multiple sclerosis.	73
II.A.2. Homéostasie lymphocytaire B des patients atteints d'une SEP et traités par le natalizumab et par l'IFN- β	74
II.B. Implications des lymphocytes B matures dans la CIS	77
II.B.1. Article #3 : B-cell subsets up-regulate α 4 integrin and accumulate in the cerebrospinal fluid in clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis onset	78
DISCUSSION et PERSPECTIVES	79
RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES	86

PUBLICATIONS et COMMUNICATIONS

Publications

- Lee-Chang C, Lefranc D, Salleron J, Faveeuw C, Allet C, Vermersch P, Oxombre B¹ et Prin L¹. Susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with altered B-cell subsets distribution and decreased serum BAFF levels. *Immunol Lett*. Sous press.
- Lee-Chang C, Zéphir H, Top I, Dubucquoi S, Trauet J, Prin L¹ et Patrick Vermersch¹. B-cell subsets up-regulate $\alpha 4$ integrin and accumulate in the cerebrospinal fluid in clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis onset. *Neurosci Lett*. Sous press.
- Lee-Chang C, Top I, Zéphir H, Dubucquoi S, Trauet J, Dussart P, Prin L¹ et Vermersch P¹. Primed status of transitional B cells associated with their ability to cross the blood-CSF barrier in early phases of multiple sclerosis. *Accepté*.

Communications

- Lee-Chang C, Top I, Zéphir H, Oxombre B, Dubucquoi S, Trauet J, Dussart P, Prin L¹, Vermersch P¹. Immature B cells in clinically isolated syndrome and relapsing-remitting multiple sclerosis. International Congress of Immunology (ICI). Kobe. Japan (Communication orale).
- Lee-Chang C, Top I, Oxombre B, Dubucquoi S, Trauet J, Dussart P, Prin L, Zéphir H¹, Vermersch P¹. Immature B cells in CIS and RR-MS. Club Français de Neuroimmunologie (CFNI), Paris, France (Présentation Poster).
- Lee-Chang C, Lefranc D, Faveeuw C, Vermersch P, Prin L, Oxombre B. B-cell homeostasis perturbation during acute and remission phases of experimental autoimmune encephalomyelitis. 2009. European Congress of Immunology (ECI), Berlin, Germany (Présentation Poster).
- Lee-Chang C, Top I, Zéphir H, Trauet J, Dussart P, Dubucquoi S, Labalette M, Prin L, Vermersch P. Peripheral late-immature and IgM⁺ memory B-cell balances perturbation in RR-MS and CIS patients. 2009. European Committee for Treatment and Research in Multiple Sclerosis (ECTRIMS). Düsseldorf, Germany (Présentation Poster).
- Lee-Chang C, Lefranc D, Faveeuw C, Vermersch P, Prin L, Oxombre B. Proportional changes of T-independent B-cell subsets during acute-recovery phases of experimental

autoimmune encephalomyelitis. 2008. ECTRIMS, Montréal, Canada (Présentation Poster).

¹Les auteurs ont contribués de manière égale à ce travail.

LISTE D'ABRÉVIATIONS

Ac	Anticorp
Ag	Antigène
BAFF	<i>B-cell activator factor of the TNF-family</i>
BCR	Récepteur des lymphocytes B
BHE	Barrière hémato-éncéphalique
BPT	Toxine pertussique
Breg	Lymphocyte B régulateur
CD	<i>Cluster</i> de différenciation
CFA	Adjuvant complet de Freund
CG	Centre germinatif
CMH	Complexe majeur d'histocompatibilité
CPA	Cellule présentatrice d'Ag
CSR	Commutation isotypique
EAE	Encéphalomyélite Autoimmune Experimental
EBV	Virus Epstein-Barr
FDC	Cellule dendritique folliculaire
FO	Folliculaire
FT	Facteur de transcription
HLA	<i>Human leukocyte antigen</i>
IFN	Interféron
Ig	Immunoglobuline
IL	Interleukine
LCS	Liquide cérébrospinal
OLP	Organe lymphoïde primaire
OLS	Organe lymphoïde secondaire
PLP	Protéine protéolipide
SEP	Sclérose en plaques

SHM	Hypermutation somatique
SI	Système immunitaire
SNC	Système nerveux central
TCR	Récepteur des lymphocytes T
TGF	<i>Transforming growth factor</i>
TLR	Récepteur de type Toll
TNF	<i>Tumor necrosis factor</i>
VCAM	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VLA	<i>Very late antigen</i>
Treg	Lymphocyte T régulateur
ZM	Zone marginale

LISTE d'ILLUSTRATIONS et TABLES

Illustration 1.1 : Expression des facteurs de transcription au cours de la lymphopoïèse B	14
Illustration 1.2 : Expression des facteurs de transcription au cours de la lymphopoïèse B	14
Illustration 1.3 : Structure du centre germinatif	17
Illustration 1.4 : Les récepteurs TLRs et ses ligands chez les mammifères	25
Illustration 2.1 : Représentations schématique des composants histologiques de la BHE	28
Illustration 2.2 : Structure du plexus choroïde	28
Illustration 2.3 : Transmigration leucocytaire du sang vers le tissu nerveux	31
Illustration 2.4 : Transmigration leucocytaire su sang vers le LCS	32
Illustration 3.1 : Formes cliniques de la SEP	34
Illustration 3.2 : Les follicules ectopiques	47
Table 1.1 : Phénotype des souches murines transgéniques BAFF-APRIL et leurs récepteurs	24
Table 3.1 : Composants actifs de l'adjuvant et leur rôle dans l'induction de l'EAE	38

INTRODUCTION

Les conditions de prise en charge de la sclérose en plaques (SEP) se sont modifiées, ces dernières années, grâce à l'emploi des stratégies thérapeutiques mieux ciblées. Deux exemples sont particulièrement démonstratifs. Ils concernent d'une part la lignée B, et d'autre part la barrière hémato-encéphalique. Même si ces approches paraissent prometteuses, aujourd'hui, les modalités précises de leurs effets ne sont pas clairement maîtrisées. C'est pour mieux appréhender les sites d'action potentiels de ces thérapeutiques innovantes que nous avons développé ; dans un chapitre introductif, les données les plus récentes sur l'ontogénie, la maturation et la différenciation des sous-populations lymphocytaires B, et abordé ensuite les bases cellulaires et moléculaires des échanges physiologique et pathologique entre le système immunitaire (SI) et le système nerveux central (SNC). C'est aussi dans cette perspective que s'inscrit mon projet de thèse, dont le thème essentiel concerne l'étude de l'homéostasie lymphocytaire B dans la physiopathologie de la SEP.

I. Homéostasie lymphocytaire B

Nous étudierons dans ce chapitre les principaux facteurs qui contrôlent l'équilibre des sous-populations lymphocytaires B soit au niveau **central** (le foie et la rate chez le fœtus ; la moelle hématopoïétique chez l'adulte comme organes lymphoïdes primaire, OLP), soit au niveau **périphérique** (la rate, les ganglions lymphatiques et les tissus lymphoïdes associés aux muqueuses comme organes lymphoïdes secondaires, OLS). Nous verrons qu'outre les signaux dépendants du récepteur de l'antigène (Ag) du lymphocyte B (*B-cell receptor*, BCR ou immunoglobuline de membrane) qui ont une incidence sur le contrôle du répertoire B, d'autres signaux vont aussi peser sur l'homéostasie lymphocytaire B. Nous détaillerons plus particulièrement le rôle des récepteurs de facteurs de croissance (BAFF et APRIL) et de l'immunité naturelle ou innée, les récepteurs apparentés à Toll (*Toll-like receptor*, TLR).

I.A Implications des signaux BCR

Dans l'ontogénie, le développement, la différenciation et la fonction des lymphocytes B, les signaux liés à l'engagement du BCR seront déterminants. Différents facteurs auront une influence sur la qualité des ces signaux. Certains sont liés soit au BCR lui même (qualité ; quantité ; affinité ; BCR réédité ou muté) soit à son ligand (rôle du « *self* » ; Ag soluble ou fixé, cytoplasmique ou membranaire, quantité d'Ag).

I.A.1 Développement des lymphocytes B conventionnels ou B2

I.A.1.1. Développement central

Chez le sujet adulte, la moelle osseuse est le siège de l'hématopoïèse et de la différenciation centrale des lymphocytes B. Toutes les cellules sanguines proviennent des **cellules souches hématopoïétiques** (CSH) totipotentes qui possèdent, à la fois, une capacité d'auto-renouvellement et de multipotence (capacité d'engagement dans différents lignages ou « *commitment* »). Dans les schémas classiques de l'hématopoïèse précoce, cette CSH, se différencie soit en **cellule lymphoïde progénitrice** (CLP), soit en **cellule myéloïde progénitrice** (CMP). Aujourd'hui, cette dichotomie fait cependant l'objet de débats [1, 2].

L'engagement vers la lignée lymphoïde va être notamment favorisé par les cellules de l'environnement stromal. Celles-ci participent à la rétention puis à la mobilisation des cellules progénitrices selon les modalités d'expression de CXCL12 [3]. Elles participent surtout à l'induction de l'expression de différents facteurs de transcription (FT) (Illustration 1.1). Les FT Ikaros et PU.1 vont conditionner la différenciation de la CSH en CLP, en régulant l'expression du récepteur l'IL-7R α qui est essentiel à l'initiation de la lymphopoïèse précoce [4-7]. L'expression des facteurs EBF (*Early B-cell factor*) et LRF (*Liver regeneration factor*) permet la différenciation de la CLP en **cellule pré-pro-B**, nommée CLP-2 chez la souris [5, 8]. Cette cellule perdrait alors toute capacité de différenciation en cellules T ou NK. Les FT Pax5 (*Paired box 5*) et Stat 5 (*Signal transducer and activator of transcription 5*) sont nécessaires à la maturation en **cellule pro-B** [9, 10]. À ce stade, la cellule exprime le marqueur lymphocytaire CD45R, ainsi que le marqueur CD19 spécifique de la lignée B. Les FT Pax5 et Stat5 régulent l'accessibilité de la recombinaison RAG1/2 sur le gène *Igh*. Par conséquent, ces FT participent au contrôle du réarrangement des segments des domaines variables (V_H) des chaînes lourdes V_H-D_HJ_H permettant la constitution de la chaîne μ H (V_H et C_H). Cette chaîne μ H fait partie du complexe pré-BCR. Son expression signe le **stade pré-B**, où les cellules vont aussi exprimer le marqueur CD20. Le pré-BCR est composé de deux chaînes μ H et de deux chaînes légères de substitution (*Surrogate light chains*, SLC). Ces dernières sont les produits des gènes λ -like (ou $\lambda 5$) homologue de C λ et Vpré-B homologue de V λ (Illustration 1.2). Le pré-BCR est associé à deux molécules de signalisation, I γ α et I γ β (ou CD79). L'activation de ces molécules va conduire à la fois à la prolifération intense des lymphocytes pré-B et à leur passage au stade de **Large pré-BII**, grâce à l'activation des protéines kinases LYN et SYK. Elles induisent aussi un arrêt des réarrangements sur le locus V_H et le début des réarrangements des chaînes légères (V_L) [11-13]. La cellule va alors sortir du cycle cellulaire, et le complexe pré-BCR est internalisé (stade de **Small pré-BII**). La synthèse des chaînes légères κ ou λ , qui vont remplacer le SLC (processus guidé par le facteur de transcription E2A), entraîne l'expression d'une IgM monomérique à la membrane qui va former le BCR, exprimé par les **cellules B immatures** [14].

Environ 90 % des cellules qui s'engagent dans la lymphopoïèse B n'atteignent pas le stade de cellules B immatures, probablement par défaut des signaux de survie liés à l'engagement du pré-BCR [15]. Suite à la recombinaison somatique intra-chromosomique aléatoire des gènes codant le domaine variable (V_H et V_L), 75% de cellules immatures expriment un BCR qui reconnaîtra un auto-Ag [16]. Ces cellules seront éliminées par

apoptose (BCR auto-réactif de forte affinité) [17], ou deviendront non réactives par un processus d'anergie (BCR auto-réactif de faible affinité) [18]. Un autre phénomène d'échappement est lié à la ré-édition du BCR ou *BCR-editing*, réarrangement de la chaîne L (V_L) du BCR initialement auto-réactif [19]. Les cellules B immatures qui réussissent à passer ces premiers points de contrôle de la tolérance, quitteront la moelle osseuse et poursuivront leur développement en périphérie.

1.A.1.2. Développement périphérique

Les cellules B immatures IgM^+ , aussi connues comme **cellules transitionnelles 1** (T1) et 2 (T2) en fonction de leur stade de maturation, migrent de la moelle osseuse vers la rate par l'action de différents récepteurs des chemokines, comme CXCR5 ou CCR2 [20, 21]. Les lymphocytes B transitionnels vont y acquérir les marqueurs de surface IgD, CD21 et CD23. Les lymphocytes B T1 sont localisés dans les manchons lymphoïdes périartériolaires (*Periarteriolar Lymphoid Sheaths*, PALS) de la rate. Les processus de tolérance interviennent toujours à ce stade de maturation. Les lymphocytes B T1, exposés aux auto-Ag, vont suivre un processus apoptotique plutôt que le *BCR-editing* ou l'anergie [22] afin de diminuer le nombre des clones auto-réactifs [16]. Les cellules qui survivent vont acquérir le phénotype des lymphocytes B T2, et se localiser dans les follicules. Des signaux dépendants du BCR ainsi que des facteurs cytokiniques et chimiokines, actifs sur la mobilisation et la domiciliation élective [23], vont permettre la différenciation des lymphocytes B T2 en cellules B matures [24-26]. Ces lymphocytes B T2 présentent aussi la potentialité de se différencier en cellules productrices d'Ac naturels (isotype IgM) [27]. Les lymphocytes B T1 et T2 qui reconnaissent des Ag avec une affinité suffisamment forte (« *strong BCR-signals* ») vont induire l'activation du facteur Btk (*Bruton's tyrosine kinase*) et se différencier en lymphocyte B folliculaire (FO). En revanche, ces lymphocytes B T1 et B T2 qui ne reconnaissent pas l'Ag avec suffisamment d'affinité pour activer Btk (« *weak BCR-signals* ») se différencient en lymphocyte B de la zone marginale (ZM).

- Les lymphocytes B de la zone folliculaire

En fonction de la qualité des signaux du BCR, la cellule B transitionnelle peut se différencier en **lymphocyte B folliculaire** (FO). Ces lymphocytes B matures et naïfs sont localisés dans les follicules primaires des OLS grâce à l'action de la chimiokine CXCL13 sécrétée par l'environnement stromal folliculaire. Les lymphocytes B FO vont alors migrer au travers du réseau réticulaire des follicules pour faciliter la rencontre avec son Ag, présenté par les cellules dendritiques folliculaires (FDC) et les macrophages des sinus sous-capsulaires sous forme d'icosomes [28, 29].

Si l'activation du BCR n'a pas lieu, les lymphocytes B FO quittent le follicule et retrouvent la circulation sanguine. Ce mécanisme est probablement facilité par l'action du récepteur lysophospholipidiques S1P1 exprimé à la surface des lymphocytes B [30]. Si l'activation du BCR a lieu, les lymphocytes B FO vont alors augmenter l'expression du récepteur CCR7 que permettra leur migration vers la zone T, et ainsi se localiser dans la zone T-B [31]. Cette nouvelle distribution va permettre l'interaction des lymphocytes B avec des lymphocytes T auxiliaires CD4⁺ (Th) exprimant le récepteur CXCR5, aussi nommés lymphocyte Th pré-folliculaire (pré-Tfh) [32]. Cette interaction va conditionner différents destins pour le lymphocyte B FO (Illustration 1.3) :

D'un part, cette interaction donne lieu à la différenciation des lymphocytes B FO en **plasmocytes extra-folliculaires de courte durée de vie**, sécréteurs d'IgM principalement [33]. Dans certains cas ces plasmocytes pourront produire des auto-anticorps (Ac) [34]. D'autre part, l'activation va induire la migration des lymphocytes B FO vers les follicules secondaire grâce à l'expression de Bcl6 (*B-cell lymphoma 6*) et ainsi former le **centre germinatif** (CG). Dans la zone sombre du CG localisée près de la zone T, ces cellules vont alors exprimer le CXCR4, inhiber l'expression du BCR et proliférer en tant que **centroblastes** [35]. Ces derniers vont exprimer l'enzyme déaminase AID (*Activation-induced cytidine deaminase*) et initier le programme de maturation de l'affinité par le processus d'**hypermutation somatique** (*Somatic hypermutation, SHM*) des domaines variables des chaînes L et H des Ig. Le plus souvent, le processus de SHM conduit à une diminution de l'affinité du BCR pour les auto-Ag. Ce phénomène constitue une nouvelle étape dans le contrôle de l'auto-réactivité. Après la réexpression membranaire du BCR « modifié », les centroblastes peuvent interagir avec les icosomes présentés par les FDC, particulièrement abondantes dans les zones claires du CG. La mobilisation des centroblastes vers les zones

claires des CG et leur activation par les FDC va induire l'arrêt du cycle cellulaire et la transition vers le stade de **centrocyte**. Ces derniers peuvent alors interagir et activer les lymphocytes Th folliculaires (Tfh) (interaction CMH de classe II et TCR). En fonction de la « nouvelle » affinité de leur BCR, les Tfh peuvent induire l'apoptose des centrocytes par l'expression de la molécule Fas (BCR forte affinité, sélection négative) [36] ou induire la survie des centrocytes par l'intermédiaire de CD40L et la sécrétion de l'IL-4 et l'IL-21 (sélection positive) [37]. La majorité des centrocytes qui bénéficie de la sélection positive, vont alors subir une commutation isotypique (*Class switch recombination*, CSR) qui conduit à la production d'Ac de classe IgG, IgA ou IgE [38]. Ils quittent le CG comme étant des **lymphocytes B mémoires**.

Les lymphocytes B mémoires constituent un groupe de cellules minoritaire à très longue durée de vie. La grande majorité de ces cellules exprime le marqueur de surface CD27 même si une petite fraction de lymphocytes B mémoires CD27⁻ a été identifiée [39]. Il existe plusieurs types des cellules B mémoires : (i) les lymphocytes B mémoires « switchées » (CD27⁺ IgD⁻ IgG/A/E⁺) et (ii) les cellules B mémoires « non-switchées » qui comprennent les cellules B mémoire IgM^{seule} (CD27⁺ IgD⁻ IgM⁺) et les cellules B de la zone marginale (ZM) ou IgM⁺. Ces derniers présentent une différenciation distincte de celle des lymphocytes B FO. Lors d'une réponse immunitaire secondaire (*Antigen recall*), certaines de ces lymphocytes B mémoires peuvent présenter rapidement et efficacement l'Ag aux lymphocytes T et se différencier en **plasmocytes**. Les lymphocytes B mémoires peuvent aussi recommencer de nouveaux cycles de sélection et de SHM dans les CG, permettant d'élargir le répertoire et ainsi d'optimiser la mémoire immunitaire de l'individu avant de se différencier en plasmocytes. À la fin de la réponse immunitaire, certains plasmocytes vont se localiser au niveau de la ZM des PALS et au niveau de la moelle osseuse. Leur fonction consistera à sécréter des Ac qui seront distribués dans l'ensemble de l'organisme.

- Lymphocytes B de la zone marginale

Une signalisation faible, dépendant du BCR, conduit à la différenciation des cellules transitionnelles en **cellules B de la zone marginale**. Ce passage ne nécessite pas l'implication des lymphocytes T [40].

Chez la souris, les lymphocytes B de la ZM (IgM^{high} IgD^{low} CD23⁻ CD21⁺ CD1d⁺) constituent 10 à 15 % du pool total des lymphocytes B [41]. Ils présentent un phénotype de

cellule « pré-activée » avec une forte expression du CMH de classe II, le CD40, le CD80 et le CD86. Ces lymphocytes B de la ZM expriment les récepteurs S1P1 et S1P3 qui jouent un rôle dans la survie des lymphocytes B de la ZM en induisant des signaux anti-apoptotiques [42]. Ces récepteurs, avec les intégrins $\alpha L\beta 2$ et $\alpha 4\beta 1$, permettent leur rétention dans la ZM de la rate [43-45]. La ZM de la rate contient également des cellules dendritiques non-résidentes (CD11c^{low} Mac-1^{high}) ainsi que des macrophages métalophiles, bordant le sinus marginal et exprimant le récepteur SIGLEC-1 (*Salic acid binding immunoglobulin-like lectin-1*) qui favorisera sa localisation. Il existe aussi une population des macrophages « éboueurs » (*scavengers*) dispersés dans la ZM. Ils expriment les récepteurs de type lectine C SIGNR1 (*Specific intercellular adhesion molecule-grabbing non integrin receptor-1*) et le récepteur « scavenger » MARCO (*Macrophage receptor with collagenous structure*). Ces CPA pourraient jouer un rôle important dans l'activation des lymphocytes B de la ZM [46-48]. Ainsi, la reconnaissance de l'Ag par les lymphocytes B de la ZM peut être directe, suite au passage du courant sanguin, ou dépendante de CPA. Les lymphocytes B de la ZM vont alors proliférer et se différencier rapidement en plasmocytes sécréteurs d'Ac de basse affinité (principalement d'isotype IgM). Grâce à cet état « pré-activé », les lymphocytes B de la ZM constituent la première ligne de défense de l'organisme contre des pathogènes tels que les bactéries encapsulées provenant du flux sanguin [49], avant même que la réponse adaptative soit assurée par les lymphocytes B FO [50]. Bien que les lymphocytes B de la ZM soient considérés comme des cellules sentinelles immobiles, ils participent en fait à des nombreux échanges de messages avec d'autres populations cellulaires (lymphocyte T, cellule dendritique folliculaire, NKT...). Ils présentent, en effet, la capacité, après engagement de leur BCR, de se délocaliser vers les follicules et de se différencier en plasmocytes ou d'engager une réponse immune T-dépendante par l'intermédiaire de différentes molécules de surface. Le CD21 (ou *complement receptor 2*, CR2) est responsable de la présentation facilitée de l'Ag, capturé par le BCR, aux FDC. Cette activation conduit à la formation des CG et à l'initiation d'une réponse immunitaire adaptative [51]. Les cellules B de la ZM sont aussi capables de présenter des Ag protéiques directement aux cellules T par l'action coordonnées de leur CMH de classe II et des molécules de co-stimulation de la famille B7 (CD80 et CD86) [52]. La molécule CD1d (CMH de classe I non-polymorphique) est fortement exprimée à la surface des cellules B de la ZM. Elle interagit avec les Ag lipidiques qui seront présentés aux cellules NKT (*Natural killer T cell*) [53].

Chez l'Homme, la structure de la ZM de la rate est différente de celle de la souris. Cependant, les cellules B de la ZM humaines (aussi connues comme cellules B mémoire IgM^+) partagent des similitudes fonctionnelles et phénotypiques avec les cellules B de la ZM murines. Ces cellules $CD27^+ IgM^+ IgD^{low} CD23^- CD21^+ CD1c^+$ et pour la plupart $CD5^-$ [54] [55] représentent entre 10 et 15% du compartiment B circulant. De plus, et comme chez la souris, elles sont capables de répondre rapidement aux Ag T-indépendants en se différenciant en cellules sécrétrices d'Ac [55]. Les lymphocytes B de la ZM humains peuvent aussi participer à la réponse immune T-dépendante en agissant comme CPA vis-à-vis des Ag protéiques, par des mécanismes similaires à ceux observés chez la souris. Cependant, l'équivalence fonctionnelle entre le récepteur CD1c des lymphocytes B de la ZM humains et le récepteur CD1d décrit sur le lymphocyte de la ZM de la souris reste inconnue. En revanche, à la différence des cellules B de la ZM murines, les lymphocytes B de la ZM humains sont capables de ré-circuler dans le flux sanguin. La majorité de ces cellules présente des niveaux bas de SHM de leur BCR, d'où un répertoire B restreint [56]. Ainsi, les lymphocytes de la ZM sont capables de produire très rapidement des Ac de classe IgM dirigés contre un nombre limité d'Ag « conservés » véhiculés par le sang [57]. Comme les lymphocytes B T2 que nous avons évoqués préalablement et les cellules B B1 que nous évoquerons dans un chapitre ultérieur, les lymphocytes B de la ZM participent à l'élaboration du répertoire des Ac naturels. En effet, des études menées chez les patients atteints du syndrome d'hyper-IgM lié au chromosome X, caractérisé par une mutation avec défaut d'expression du gène *CD40L* (présence massive de cellules B de la ZM et absence de lymphocytes B mémoires), ont permis de mettre en évidence que la diversification du répertoire B peut néanmoins se produire en dehors de la réponse immunitaire T-dépendante, de la formation des CG et avant même la rencontre avec l'Ag [40].

- Lymphocytes B anergiques

Chez la souris, une population de **cellules B anergiques** a été décrite. Ces cellules sont aussi connues comme cellules B T3 ou An1 ($CD93^+ CD23^+ IgM^{low}$). Elles ne sont cependant pas considérées comme une population intermédiaire après les stades T1 ou T2. Ces lymphocytes B T3 constitueraient un compartiment indépendant, probablement issue d'une exposition continue aux auto-Ag [58, 59]. Chez l'Homme, ces cellules B anergiques ont été

récemment caractérisées comme de cellules B naïves auto-réactives, qui n'expriment pas le récepteur CD21 (CD19⁺ CD27⁻ CD21^{-/low}) [60].

I.A.2 Développement central et périphérique des lymphocytes B B1

Ces **lymphocytes B B1** ont été identifiés initialement chez la souris comme des cellules B IgM⁺ IgD⁺ exprimant le marqueur CD5 [61, 62]. Cette population, minoritaire chez l'animal adulte, est majoritaire chez le nouveau-né. Contrairement aux lymphocytes B conventionnels (lignée B B2), qui sont constamment renouvelés dans la moelle osseuse à partir de précurseurs totipotents ; les lymphocytes B B1 seraient dotés d'une capacité d'auto-renouvellement à partir d'un pool donné de précurseurs essentiellement retrouvés dans le foie fœtal [63]. Ces précurseurs ne seraient pas situés dans la moelle osseuse. En effet, des expériences de greffe de moelle osseuse sur souris irradiées n'ont pas permis de reconstituer cette population [64]. De plus, la cytokine homéostatique IL-7, nécessaire lors du développement central de la lignée B B2, ne serait pas requise pour la formation de lymphocytes B B1 [65, 66]. Des données récentes indiquent cependant qu'une partie de la population B1 pourrait dériver de précurseurs provenant de la moelle osseuse [67]. Contrairement aux lymphocytes B B2, des BCR auto-réactifs de forte affinité seraient nécessaires pour maintenir le pool B1 au cours du développement fœtal. En revanche, et de façon paradoxale, des lymphocytes B porteurs de BCR auto-réactifs de faible affinité deviendrait tolérants (« *receptor editing* », apoptose) [68, 69].

En périphérie, les lymphocytes B B1 sont principalement localisés, dans les cavités pleurale et péritonéale et, en nombre moindre, dans la rate et les ganglions lymphatiques. Deux types des lymphocytes B B1 ont été identifiés: les lymphocytes B B1a et les B B1b. Les **lymphocytes B B1a** (B220^{low} CD19^{high} IgM^{High} IgD^{low} CD43⁺ Mac-1⁺ CD5⁺) contribuent à la réponse immune innée grâce à la production d'auto-Ac naturels principalement de classe IgM, en absence de stimulation antigénique [70]. En présence d'activateurs cellulaires de type lipopolysaccharide (LPS), les lymphocytes B B1a péritonéaux migrent rapidement vers la rate où ils vont proliférer et se différencier en cellules productrices d'Ac d'isotype IgM [71]. On peut ici évoquer le rôle des TLR que nous développerons dans un chapitre ultérieur. Les **lymphocytes B B1b** présentent le même phénotype que les lymphocytes B1a mais n'expriment pas le marqueur CD5. Ces cellules seraient la principale source entretenue d'Ac

contre des polysaccharides et autres Ag T-indépendant de type 2 dans le cadre des réponses immunes adaptatives [72]. Elles sont aussi capables de subir les processus de SHM et CSR, et ainsi de sécréter des Ac d'isotype IgA dans la cavité péritonéale [73].

L'existence d'une population lymphocytaire B B1 chez l'Homme reste aujourd'hui hypothétique. Différentes données suggèrent que les lymphocytes B mémoire de la ZM sont fonctionnellement équivalents aux lymphocytes B B1a murines [74].

I.B Implications d'autres signaux

I.B.1 BAFF/APRIL et leurs récepteurs dans le contrôle de l'homéostasie des cellules B

Comme nous l'avons exposé précédemment, la qualité des signaux du BCR est impliquée dans la survie et le développement des lymphocytes B. Néanmoins, d'autres signaux dépendants de facteurs de croissance, sont également requis afin que les cellules B transitionnelles puissent compléter leur développement.

BAFF (*B-cell activator factor of the TNF-family*) et **APRIL** (*A proliferating inducing ligand*) constituent des facteurs critiques pour la survie et la différenciation des lymphocytes B, ainsi que pour la formation du CG et la production des Ig. Ces deux ligands, membres de la famille TNF (*Tumor necrosis factor*), sont produits principalement par des cellules de l'immunité innée, telles que les neutrophiles, les macrophages, les monocytes, les cellules dendritiques et les FDC [75, 76]. Leur expression est induite par différentes cytokines, comme les interférons (IFN) de type I (IFN- α et - β) et type II (IFN- γ), l'interleukine (IL)-10 et le G-CSF (*Granulocyte-colony stimulating factor*) [77, 78], ainsi que par l'activation des TLR [79, 80]. BAFF peut aussi être constitutivement synthétisé par des cellules stromales radio-résistantes, présentes dans les tissus lymphoïdes Gorelik 2003. Enfin, des cellules de l'immunité adaptative, telles que les cellules T [81] et B activées [82] sont aussi sources de BAFF et d'APRIL.

BAFF et APRIL interagissent avec les récepteurs **BCMA** (*B-cell maturation antigen*, TNFRSF17) ou **TACI** (*Transmembrane activator and calcium modulator and cyclophilin ligand interactor*, TNFRSF13B). Si BAFF interagit également avec **BAFF-R** (*BAFF-receptor*, BR3 ou TNFRSF13C), en revanche APRIL est ligand aussi des chaînes polysaccharidiques de protéoglycanes (*heparan sulphate proteoglycans*, HSPG). HSPG n'est

ni structurellement apparentées aux autres récepteurs, ni impliquées dans le contrôle de l'homéostasie des lymphocytes B [83-86].

De nombreux travaux, développés dans différentes souches de souris transgéniques, ont permis d'identifier l'implication de ces différents récepteurs dans l'homéostasie lymphocytaire B (Table 1.1). L'interaction BAFF/BAFF-R contrôlerait la survie et le développement des cellules B conventionnelles, au-delà du stade T1 [87-89]. De plus, BAFF et BAFF-R participent à la construction des CG, car en leur absence les CG ne sont pas stables [90, 91]. D'autres fonctions ont été attribuées à BAFF. En plus de la survie du pool des cellules B et des plasmocytes, BAFF régule l'expression des marqueurs de surface CD21 et CD23 [92]. BAFF et APRIL pourraient aussi réguler la sécrétion T-indépendante d'Ac en favorisant la survie des plasmablastes provenant soit de cellules B B1 soit de la ZM [93]. De son côté, APRIL régule le processus de CSR de manière CD40-indépendante [94] et permet la survie des plasmocytes [95]. TACI participe à l'activation de la réponse humorale des cellules B de l'immunité innée (cellules de la ZM et B1) [96-98] et régule négativement l'expansion du pool B [99, 100]. BCMA contribue à la maintenance des plasmocytes [101] et induit la fonction CPA des cellules B [102]. Il est important de noter que les cellules B mémoires ne sont pas dépendantes des signaux BAFF et APRIL [103].

Table 1.1 : Phénotype des souches murines transgéniques BAFF-APRIL et leurs récepteurs.

	<i>Baff</i> ^{-/-}	<i>April</i> ^{-/-}	<i>Baff-r</i> ^{-/-}	BAFF-R mutante ¹	<i>Taci</i> ^{-/-}	<i>Bcma</i> ^{-/-}
Cellules B périphériques	↓↓↓	N	↓↓↓	↓↓↓	↑↑↑	N
Cellules B de la ZM	↓↓↓	N	↓↓↓	↓↓↓	N	N
Cellules B B1	N	N	N	N	N	N
Titres d'Ac et commutation isotypique	↓↓ ²	↓ ³	↓↓↓ ²	N	↓↓ ³	N
Pool plasmocyte	N	N	N	N	N	↓↓↓
Expression CD21	↓↓↓	ND	↓	↓	ND	ND
Expression CD23	↓↓↓	ND	↓	N	N	N
Centre germinatifs	↓↓↓ ⁴	↑↑↑	↓	↓ ⁵	ND	ND
Réponse TI	↓↓	N	N	N	↓↓	N
Réponse TD	↓↓ ⁶	↓↓ ⁷	↓↓ ⁶	N	↑↑↑	N

N : Normal ; ND : Non déterminé

¹ Souche A/WyS_{snj} qui présente une mutation dans le gène *Baff-r* ; ² À exception d'IgA ; ³ Titre d'IgA réduite ; ⁴ Pas de follicules dans les OLS formés par des FDC ; ⁵ et absence de cellules B Ki67⁺ (phénotype caractéristique des centrocytes) ; ⁶ Spécialement les isotypes IgM et IgG ; ⁷ Altération de la réponse IgM vis-à-vis des Ag de la muqueuse.

D'après Schneider P. 2005. *Curr Opin Immunol* [104] et Mackay F *et al.* 2009. *Nat Rev Immunol* [105].

I.B.2 Les récepteurs de type Toll et l'homéostasie lymphocytaire B

Les PRRs (*Pattern recognition receptors*) sont caractérisés par leur capacité à reconnaître des motifs moléculaires conservés des agents pathogènes, appelées PAMPs (*Pathogen associated molecular patterns*). Parmi un large panel de PRRs, on trouve les **récepteurs TLRs** qui sont apparentés au produit du gène *Toll* de la Drosophile [106]. Des nombreux TLRs ont été décrits chez les mammifères. La majorité de ces récepteurs est constitutivement exprimée dans différents types cellulaires du système immunitaire inné et adaptatif, tels que les cellules dendritiques, les macrophages, les cellules NK, les mastocytes, les neutrophiles et les lymphocytes T et B [107-113]. Les TLRs sont aussi exprimés par d'autres types cellulaires comme les fibroblastes, les cellules épithéliales ou les kératinocytes [114-116]. Ces récepteurs sont trouvés sous forme d'homo ou d'hétérodimères (TLR-2+TLR-1 ou TLR-2+TLR-6), à la surface de la membrane plasmique (TLR-1, 2, 4, 5, 6, 10 et 11) ou dans les compartiments endosomaux (TLR-3, 7, 8 et 9) (Illustration 1.4). Chez l'Homme, le spectre des TLRs identifié est le même que celui trouvé chez les autres mammifères à l'exception du TLR-11 [117]. Suite à l'activation des TLRs, le signal de transduction intracellulaire implique principalement la protéine adaptatrice MyD88 (*Myeloid differentiation factor 88*) et la translocation du facteur NF- κ B (*Nuclear factor kappa-light-chain-enhancer of activated B cells*) qui s'associe à l'activation des MAP (*Mitogen-Activate Protein*) kinases telles que PKB/Akt (*Protein Kinase B*), Erk (*Extracellular signal-regulated kinase*) et JNK (*Jun N-terminal Kinase*), et la phosphorylation de plusieurs IRF (*Interferon Regulatory Factor*) [118, 119]. Lors de l'activation du TLR-3, la protéine adaptatrice TRIF (*TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*) est mobilisée [120]. En toute circonstance, l'activation des TLRs entraîne la synthèse des nombreuses cytokines impliquées dans la réponse immune principalement proinflammatoire (IL-6, IL-10 ou TNF- α), ainsi que l'expression des molécules de stimulation CD80, CD86 et CMH de classe II (effet adjuvant) [121, 122].

Chez l'Homme, de nombreuses études ont montré l'importance des TLRs dans l'activation des cellules B naïves ainsi que dans l'amplification de la réponse humorale spécifique ou polyclonale. Les lymphocytes B naïfs présentent un seuil d'activation plus élevé que les cellules B mémoires Arpin 1997. En effet, leur activation nécessite la combinaison de trois signaux : la stimulation du BCR, la collaboration avec les cellules T et l'activation des TLR [123, 124]. Les lymphocytes B mémoires sont plus réactifs face à l'Ag en partie grâce à

un niveau d'expression des TLR élevés [125, 126]. L'activation des TLRs par leurs ligands provoque alors une activation rapide, une multiplication puis une différenciation des cellules B mémoires en plasmocytes [27, 127-129].

Chez la souris, les lymphocytes B seraient plus sensibles à la stimulation des TLRs que chez l'Homme. Les cellules B naïves et mémoires répondent de la même manière aux agonistes des TLR *in vitro* même en l'absence d'activation du BCR [130, 131]. De plus, les sous-populations lymphocytaires B, impliquées dans la réponse T-indépendante, telles que les lymphocytes B de la ZM et B1a, répondent à plusieurs agonistes de TLR (à l'exception de la flagelline et le polyI :C) avec une prolifération et différenciation en plasmocytes *in vitro*. Ces lymphocytes B sécrètent de manière polyclonale des Ac au cours d'un processus infectieux, ce qui accentue la réponse immune innée [132-134]. En revanche, le rôle des TLRs dans la réponse immune T-dépendante est toujours controversé. Plusieurs études, sur des modèles murins, ont montré que les TLRs sont aussi capables d'initier le processus de CSR en activant l'expression de l'enzyme AID [135, 136]. Des signaux supplémentaires au BCR, tels que CD40L, BAFF, APRIL, IL-4 et/ou IL-10, sont toutefois nécessaires pour promouvoir le « *switch* » isotypique [135, 137]. Des travaux récents suggèrent que l'activation polyclonale TLR, en absence d'activation du BCR, exerce un rôle non négligeable dans le maintien de la mémoire à long terme [138] en induisant la prolifération, la migration et la survie de lymphocytes B mémoires ainsi que la formation du pool de plasmocytes polyclonaux circulants.

II. Les relations entre le système immunitaire et le système nerveux central : Aspects physiologiques

Le système nerveux central (SNC) a longtemps été caractérisé comme un organe privilégié, car considéré comme protégé de l'environnement. Différents éléments semblent légitimer cette hypothèse. Dans des conditions physiologiques, le transport des cellules immunocompétentes du sang au SNC est limité par différentes barrières hémato-encéphaliques (BHE). Il s'agit d'une structure anatomique complexe qui regroupe l'ensemble des vaisseaux et micro-vaisseaux cérébraux et qui « isole » le SNC du reste de l'organisme. L'absence de drainage lymphatique au sein du parenchyme cérébral mais aussi le manque de CPA professionnelles identifiées dans ce parenchyme sont d'autres facteurs qui témoigneraient d'un « isolement immunitaire ». Enfin, certaines cytokines anti-inflammatoires, telle que l'IL-10, et l'activation des processus apoptotiques par l'intermédiaire du ligand Fas présent à la surface des cellules résidentes du SNC, limiteraient la mise en place d'une réponse inflammatoire agressive pour ce tissu.

II.A. La barrière hémato-encéphalique (BHE) et ses interfaces

La **BHE** a été décrite pour la première fois au début du XX^{ème} siècle par le physiologiste P. Ehrlich, à la suite de l'emploi des techniques de coloration *in vivo* de tissus cérébraux. Le tissu cérébral ne pouvait alors être coloré qu'à la suite d'injections intraventriculaires et non systémiques. Ainsi, le concept de l'existence d'une « barrière vasculaire » isolant le SNC fut établie. La BHE constitue un « filtre cérébral » permettant de contrôler l'entrée et la sortie de substances entre le sang et le SNC. Cette propriété s'exerce grâce à deux zones d'échanges dont les caractéristiques seront développées dans les paragraphes suivants.

II.A.1 L'interface sang-parenchyme cérébral

L'**interface sang-parenchyme** est constituée par des cellules endothéliales cérébrales caractérisées par la présence de jonctions serrées et de jonctions adhérentes. Les jonctions serrées sont constituées de différentes molécules transmembranaires telles que les occludines,

les claudines, les molécules des jonctions adhérentes (*Junctional adhesion molecules*, JAM) et les protéines accessoires zonula occludens (ZO) ZO-1, ZO-2 et ZO-3 [139, 140]. Les jonctions adhérentes sont principalement constituées par les cadherines vasculaires endothéliales (VE-cadherines). L'endothélium de la BHE repose sur une lame basale, composée de différents types de laminines (laminine-1, -2, -4 et -5) mais aussi de collagène de type IV, de fibronectine et de protéoglycanes (*Heparine-sulfate-proteoglycanes*, HSP). Cet endothélium et sa lame basale sont entourés de péricytes et d'un réseau de pseudopodes astrocytaires qui vont isoler le réseau vasculaire au sein même du SNC (Illustration 2.1) [141]. Ainsi, plusieurs feuilletts phospholipidiques superposés limitent la pinocytose et la diffusion simple des composés hydrophiles, mais non le passage des molécules d'eau. En effet ces dernières sont capables de traverser l'endothélium cérébral par simple diffusion et par voie vésiculaire grâce au système des aquaporines [142-144]. En revanche, l'apport au parenchyme cérébral de nutriments, métabolites et ions nécessite des systèmes actifs de transport assurés par des transporteurs membranaires spécifiques (membres de la famille ABC ou *ATP-Binding Cassette*, famille SLC ou *Solute Carrier*) [145, 146] mais aussi par l'internalisation par endocytose de récepteurs spécifiques (récepteur de la transferrine, de l'insuline, de l'IGF ou *Insuline-Like Growth Factor* et de la leptine) [147-150].

II.A.2 L'interface sang-liquide cérébrospinal

L'**interface sang-liquide cérébrospinal** (LCS) est localisée au niveau des plexus choroïdes. Le LCS est constitué de plasma ultra-filtré, sécrété par les cellules épithéliales du plexus choroïde. Il possède différentes propriétés : nutrition, élimination de produits du catabolisme cérébral, voie de communication endocrine entre les différentes aires cérébrales. À la différence de l'interface sang-parenchyme cérébral, les cellules endothéliales des plexus choroïdes sont fenestrées. Elles n'exercent donc pas la fonction de barrière. La barrière sang-LCS est assurée par les cellules épithéliales épendymaires (épendymocytes) qui sont en contact direct avec le LCS (Illustration 2.2) [151]. Leur fonction de barrière est assurée par la présence des jonctions serrées, composées par des claudines, des occludines et de la ZO-1 [152]. L'afflux d'eau et d'ions, nécessaires à la production du LCS, est facilité par la présence de canaux aqueux, comme l'aquaporine [153, 154] et de transporteurs ioniques, qui permettent la création d'un gradient. Comme nous l'avons vu précédemment lors de la

description de l'interface sang-parenchyme cérébral, la présence de transporteurs spécifiques est ici aussi nécessaire afin de permettre l'afflux des nutriments.

II.B L'immuno-surveillance du SNC

Le SNC a longtemps été considéré comme un organe immuno-privilegié. Cependant, des données plus récentes mettent en évidence l'importance des interactions entre le SNC et le SI qui permettent une protection permanente du SNC. Trois observations sont en faveur de cette notion d'immuno-surveillance du SNC. Nous allons les développer ci-dessous.

II.B.1 L'existence d'une communication entre le SNC et la circulation lymphatique par l'intermédiaire du LCS

Le liquide interstitiel du SNC est drainé dans les espaces péri-vasculaires appelés espaces de Virchow-Robin avant de gagner le LCS. Celui-ci, produit au niveau des plexus choroïdes, circule entre les ventricules et l'espace sous-arachnoïdien (localisé au niveau des méninges entre la membrane arachnoïdienne et la pie-mère). Il est résorbé au niveau des sinus arachnoïdiens. Plusieurs équipes ont cependant démontré que le LCS est aussi capable de circuler vers les ganglions lymphatiques cervicaux en suivant la racine des nerfs crâniens [155-157]. Il existerait deux voies de **communication entre le SNC et le système lymphatique** : (1) la voie afférente qui permet le transit d'Ag du parenchyme cérébral vers les ganglions cervicaux par le LCS et (2) la voie efférente qui permet l'arrivée au sein du parenchyme de lymphocytes activés dans les OLS après la présentation des neuro-Ag par les CPA [157].

II.B.2 L'existence d'un environnement immunologique au sein du SNC

Les cellules dendritiques sont les CPA professionnelles les plus efficaces pour la stimulation d'une réponse immune. Ce type cellulaire est absent du parenchyme cérébral, mais les **cellules microgliales** jouent cette fonction. En absence d'inflammation, seul un très faible contingent de ces cellules exprime des molécules du CMH de classe II. Les cellules microgliales, d'origine myéloïde, semblent participer plus activement à la réponse immune innée. En effet, la microglie du parenchyme protège le tissu nerveux grâce à l'expression

constitutive d'un large spectre de TLRs (TLR1-9) [158-161]. La distribution particulière du système microglial permet la reconnaissance de pathogènes provenant de la périphérie ou du parenchyme cérébral. L'expression des TLRs est augmentée lors d'une infection virale ou bactérienne, de l'adjonction d'agonistes de ces récepteurs ou au cours d'un processus d'agression auto-immun du SNC. Cette surexpression conduit à la sécrétion de cytokines (IFN- α , IFN- β , IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-12, IL-18, TNF- α , monoxyde d'azote) et chimiokines (MIP-1a, MCP-1, RANTES) [162, 163] qui vont amplifier la réponse immune. Elle entraîne aussi une augmentation de l'expression des molécules du CMH de classe II et de marqueurs d'activation (CD45, CD80, CD86, LFA-1, CD40, ICAM-1 et VCAM-1) qui va permettre le recrutement et l'activation de cellules de l'immunité adaptative au sein SNC [162, 164].

En dehors du parenchyme cérébral, il existe différentes sous-populations de cellules dérivant de la moelle osseuse, résidant dans les interfaces sang-tissu cérébral et sang-LCS et possédant la fonction de CPA. Cette dernière est assurée par les **macrophages ou les cellules microgliales** présentes dans les espaces péri-vasculaires des micro-vaisseaux cérébraux [165]. À la différence de la microglie parenchymateuse, les CPA péri-vasculaires sont constamment reconstituées par la moelle osseuse [166, 167]. Ces cellules jouent un rôle de sentinelle au niveau de la BHE afin de préserver le SNC d'éventuelles lésions tissulaires ou de l'intrusion de pathogènes en régulant le recrutement des lymphocytes et leur activation au sein du parenchyme. Dans les méninges et les plexus choroïdes une faible population de **macrophages et de cellules dendritiques** est également présente [168]. Ces cellules sont aussi considérées comme sentinelles à l'interface sang-LCS. Leur fonction principale est probablement de transporter l'Ag du LCS vers les ganglions cervicaux [169, 170].

III.B.3 La transmigration leucocytaire vers le SNC

Le **trafic leucocytaire**, en condition physiologique, constitue une des spécificités de l'immuno-surveillance du SNC. Le passage des cellules immunocompétentes de la périphérie vers le SNC est un processus strictement régulé à la fois dans des conditions homéostatiques et inflammatoires. Trois voies de transmigration leucocytaire ont été principalement décrites [157].

Dans la **première voie**, les cellules transitent du sang vers le LCS à travers les cellules fenestrées de l'endothélium des plexus choroïdes. Cette voie a très probablement une importance physiologique dans la mesure où le LCS d'un individu sain présente

approximativement 10^3 leucocytes/ml. La plupart de ces cellules sont des lymphocytes T (~80%), dont le phénotype T CD4⁺ mémoire central est le plus abondant. Le LCS contient aussi des monocytes (~20%) et les lymphocytes B (~1%) [171].

La **deuxième voie** de migration vers le SNC implique la circulation sanguine et l'espace sous-arachnoïdien. Les leucocytes migrent des micro-vaisseaux post-capillaires de la surface de la pie-mère vers les espaces sous-arachnoïdiens et péri-vasculaires de Virchow-Robin, où ils vont pouvoir interagir avec les CPA péri-vasculaires.

La **troisième voie** de migration permet aux leucocytes de passer de la circulation sanguine aux espaces péri-vasculaires parenchymateux, où ils peuvent pénétrer directement dans le parenchyme cérébral par la BHE.

Les deux premières voies ont un rôle important en conditions physiologiques alors que la troisième n'est empruntée qu'au cours d'un événement inflammatoire car seuls les lymphocytes activés peuvent transmigrer.

Ces trois voies de transmigration leucocytaire nécessitent que les lymphocytes traversent l'endothélium des vaisseaux cérébraux afin de s'introduire dans le SNC. Ce processus se divise en quatre étapes : 1) l'attachement et l'enroulement (*tethering and rolling*) ; 2) l'activation des intégrines ; 3) l'adhésion ferme (*flattening*) et 4) l'extravasation (Illustration 2.3). La première étape implique des interactions entre les sélectines et ses ligands qui forment une liaison instable entre les leucocytes et les cellules endothéliales [172-174]. Des signaux chimiotactiques homéostatiques, tels que CCL19 et CCL21, sont sécrétés par l'endothélium de la BHE [175]. Ils sont nécessaires à l'orchestration spatio-temporelle des lymphocytes dans la circulation sanguine. Ces chimiokines stimulent l'expression de récepteurs hétéro-trimériques couplés à la protéine G ou GPCR (*G-protein-coupled receptor*) à la surface de lymphocytes. L'activation de ces récepteurs va augmenter la capacité migratoire de ces cellules par un réarrangement du cytosquelette [176]. Le contact entre endothélium et lymphocytes est alors renforcé grâce à une adhérence ferme entre les molécules d'adhésion exprimées à la surface de l'endothélium de la BHE et leurs récepteurs associés aux lymphocytes [177-179]. La transmigration leucocytaire se finalise par la diapédèse des lymphocytes à travers la paroi endothéliale. Le processus de migration transendothéliale est facilité par l'activité des métallo-protéases de la matrice MMP-9 et MMP-7 (*Matrix metalloproteinase*) qui perturbent l'équilibre structurel de l'endothélium [180, 181]. Cette migration est aussi sous le contrôle de facteurs chimiotactiques présents dans les

cellules endothéliales et microgliales péri-vasculaires, tels que CXCL10, CCL1, CCL2 et CCL5 [182].

Dans le cas particulier de la transmigration sang-LCS, les lymphocytes migrent au travers de l'épithélium des plexus choroïdes, plus permissif que l'endothélium de la barrière sang-parenchyme cérébral, après avoir traversé l'endothélium qui ne présente pas de jonctions serrées. Les mécanismes impliqués dans la transmigration épithéliale sont similaires à ceux décrits précédemment. L'environnement stromal du plexus choroïde pourrait fournir des signaux chimiotactiques (CXCL-13, CCL-19, CCL-20) qui permettent l'attraction des leucocytes vers l'épithélium [183-185]. L'action des lectines et des molécules d'adhésion finalise la transmigration épithéliale (Illustration 2.4) [186, 187].

II.C L'importance de l'immuno-surveillance du SNC

De nombreux travaux ont souligné la présence des lymphocytes T au sein du SNC en condition physiologiques [188]. Dans le LCS de sujets sains, la majeure partie des cellules T présente un phénotype T CD4⁺ mémoire central (CD45RO⁺ CCR7⁺ CD27⁺ L-selectine⁺) [171]. Ce lymphocyte va exprimer le récepteur CCR5 et produire de l'IFN- γ lorsqu'il rencontre son Ag. En revanche, si la cellule ne rencontre pas son Ag, elle quitte le SNC et ré-circule probablement vers les organes lymphoïdes secondaires comme les ganglions cervicaux [188].

Le rôle des cellules B en condition physiologique est loin d'être élucidé. L'existence d'Ig intrathécales spécifiques d'Ag a cependant été démontrée en conditions physiologique [189]. Aujourd'hui, ce sont surtout des arguments indirects qui soulignent le rôle des lymphocytes B dans l'immuno-surveillance, mais aussi dans les processus de réparation et de neuro-protection [190]. Ainsi, l'utilisation des bio-thérapies comme la déplétion des cellules B (Ac anti-CD20) ou l'inhibition de l'entrée lymphocytaire dans les SNC (Ac anti-VLA-4) peut induire une leucoencéphalopathie multifocale progressive (LEMP), maladie provoquée par l'infection du virus JC. Une grande majorité de la population mondiale est séropositive pour ce virus, mais seuls les sujets immunodéprimés ou atteints d'une maladie auto-immune et traités par ces bio-thérapies actives sur l'immunité risquent de développer cette grave affection. La LEMP se caractérise par la présence des plaques démyélinisées entourées de macrophages et d'astrocytes multi-nucléés. La dissémination progressive mais rapide du virus (en phase lytique) provoque dans la plupart de cas, le décès du patient [191]. En conclusion, le

SI exerce un rôle protecteur permanent sur le SNC que cela soit en conditions physiologiques ou pathologiques.

III. Les relations entre le système immunitaire et le système nerveux central : Aspects pathologiques - La sclérose en plaques

Dans le chapitre précédent, nous avons décrit les échanges entre le SI et le SNC en conditions physiologiques. Ces relations permettent de protéger le SNC en cas d'agressions externes. Cependant cette communication peut parfois s'avérer défavorable. En effet, une réponse immunitaire inappropriée dirigée contre le SNC peut conduire au développement de pathologies telles que la sclérose en plaques.

III.A. Aspects généraux de la sclérose en plaques

III.A.1 Aspects cliniques

La sclérose en plaques (SEP) est une maladie inflammatoire, démyélinisante et dégénérative du SNC, débutant habituellement chez des sujets jeunes (entre 20 et 40 ans) avec une prédominance féminine (2 femmes pour 1 homme). Son incidence est d'environ 7 nouveaux cas par an pour 100 000 habitants. Sa prévalence est approximativement de 1 /1 000 habitants dans les régions du nord de l'Europe, et de 1/2 000 habitants en France [192]. Chez 50 % des patients SEP un handicap permanent avec dépendance d'au moins une aide à la marche est observé après 15 ans de maladie. Cette pathologie représente la première cause de handicap non traumatique chez l'adulte jeune [193, 194]. La SEP se manifeste par une symptomatologie variée, associant fréquemment des symptômes physiques (paraparésie, ataxie, troubles visuels, génitosphinctériens) ou non (troubles cognitifs, dépression, fatigue chronique).

Classiquement, il existe trois formes cliniques de la maladie (Illustration 3.1). Environ 80% des patients développent une forme récurrente-rémittente (RR) qui est caractérisée par des épisodes de poussées suivis de rémissions complètes ou non. Après environ 15 ans de maladie, la moitié de ces sujets va développer une forme secondairement progressive (SP), où le handicap continue à progresser entre les poussées. Entre 10 et 15 % des patients développent une SEP primaire progressive (PP). Cette forme clinique est caractérisée par une aggravation progressive du handicap sans rémission et survient plus tardivement [195].

Histologiquement, la SEP se caractérise par des lésions multifocales du SNC ayant une prédilection pour les régions péri-ventriculaires, les nerfs optiques, le tronc cérébral, la moelle épinière, mais aussi les noyaux gris centraux et le cortex. Ces lésions inflammatoires sont associées à des plaques de démyélinisation et à un processus dégénératif. Néanmoins la place respective de l'inflammation et des processus neurodégénératifs dans la physiopathologie de la SEP reste l'objet de discussion [196]. Ces processus neurodégénératifs sont caractérisés par une perte axonale, des lésions diffuses de la substance blanche et une gliose astrocytaire. La composition des infiltrats est variable. Ils sont constitués des cellules microgliales activées, de macrophages, des lymphocytes B et T et parfois de plasmocytes [197]. Il a récemment été démontré que la formation des lésions serait initiée par un appauvrissement oligodendrocytaire en présence de microglie activée. Ces cellules vont alors phagocyter la myéline endommagée et, une fois activées, permettre le recrutement de plasmablastes et de lymphocytes T et B [198]. L'analyse plus précise de la composition des lésions a conduit à la mise en place d'une classification en fonction de leurs caractéristiques immuno-pathologiques [199]. Les lésions de type I et II partagent plusieurs propriétés. Ces lésions actives contiennent des lymphocytes T $CD4^+$ et $CD8^+$ et des cytokines, comme le $TNF-\alpha$, qui feraient suite à l'activation des macrophages. Elles sont caractérisées par un dommage de la gaine de myéline. A la différence des lésions de type I, les lésions de type II présentent de surcroît des dépôts d'Ig et de complément. Les lésions de type III et IV présentent aussi de lymphocytes T et des macrophages activés. Elles se différencient des lésions de type I et II par l'absence de dépôts du complément et par une démyélinisation liée à une altération oligodendrocytaire endogène. L'oligodendropathie des lésions de type III serait liée à un phénomène apoptotique, alors que dans les lésions de type IV, la mort des oligodendrocytes ne semble pas liée à un phénomène apoptotique.

III.A.2 Aspects génétiques et environnementaux

L'étiologie de la SEP demeure inconnue. Cette pathologie est considérée comme inflammatoire et dégénérative. Elle fait intervenir à la fois des facteurs génétiques et environnementaux.

Une **composante génétique** influence la susceptibilité à la maladie. En effet, le taux de concordance est de 30% chez les jumeaux monozygotes alors qu'il n'est que de 5 % chez les dizygotes. Des études effectuées sur la région chromosomique du complexe HLA (*Human*

leukocyte antigen) ont permis de mettre en évidence une relation entre la susceptibilité à la maladie et les polymorphismes du locus HLA (HLA-DQB1*0602, HLA-DQAI*0102, HLA-DRB1*1501 et HLA-DRB5*0101) [200-202]. Il existe d'autres associations génétiques avec les gènes codant les cytokines (IL-1, IL-4, IL-6, IL-10 ou TNF- α), leurs récepteurs (IL-7R ou IL-2RA), les chimiokines (CCR5) ou les molécules de co-signalisation lymphocytaire (CTLA-4) [203].

Le taux de discordance de 70 % entre les jumeaux monozygotes montre aussi l'importance des **facteurs environnementaux** dans la pathogénie de la SEP. La distribution géographique des patients SEP et l'étude des flux migratoires fournissent aussi des arguments permettant de conforter l'hypothèse de l'impact de l'environnement dans la pathogénie de la SEP. En effet, la prévalence de la pathologie est élevée dans les pays du nord de l'Europe (>1 pour 1 000 habitants) contrairement aux fréquences retrouvées dans les régions situées plus au sud ou parmi les populations d'Asie ou d'Afrique noire [204]. L'exposition solaire et la synthèse de vitamine D pourraient jouer un rôle immunoprotecteur [205].

Il existerait aussi un lien entre les agents infectieux viraux et l'apparition de poussées de SEP. Par ailleurs, diverses maladies humaines virales sont associées à un processus de démyélinisation, suite à l'infection par le virus de la leucémie/lymphome T humaine de type 1 (HTLV-1), le virus de l'immunodéficience humaine (VIH), le virus JC ou le virus de la rougeole [206]. L'implication du virus de l'herpes Epstein-Barr (EBV) a aussi été évoquée [207, 208]. En effet, les bandes oligoclonales présentes dans le LCS de patients SEP réagissent contre les Ag de ce virus [209]. Toutefois, à ce jour, aucune étude n'a pu incriminer de façon formelle cet agent infectieux dans le développement de la pathologie. En effet, l'analyse post-mortem d'une cohorte de 24 patients a démontré que l'EBV est absent de la plupart des lésions [210].

III.B L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale

L'encéphalomyélite auto-immune expérimentale (EAE) est une pathologie auto-immune démyélinisante du SNC, induite expérimentalement. Elle constitue donc un modèle animal de SEP.

III.B.1 Historique de l'EAE

Les origines du modèle EAE datent des années 1920 où une paralysie et une inflammation de la moelle épinière ont été observées chez des lapins, après inoculation répétée d'homogénat de moelle épinière humaine saine [211, 212]. Dans les années 1930, le virologue américain T. M. Rivers étudie les complications encéphalitiques associées à la vaccination antirabique en effectuant, à des macaques, des injections répétées d'émulsions préparées à partir de cerveaux de lapins infectés par le virus de la rage. De manière surprenante, certains animaux du groupe contrôle, ayant subi des injections d'homogénats de cerveaux d'animaux sains, ont présenté des difficultés motrices. Les analyses histologiques ont révélé la présence d'infiltrats péri-vasculaires et de plaques de démyélinisation au niveau cérébral [213]. L'injection répétée d'extraits protéiques préparés à partir de ces homogénats conduit à une diminution du tonus musculaire et à des difficultés motrices chez les animaux, associée à des infiltrats péri-vasculaires et à une dégénérescence de la myéline au niveau du cerveau et de la moelle épinière des animaux [214].

Parallèlement à ces analyses, l'équipe de Rivers et Schwentker a observé la présence d'Ac spécifiques d'Ag cérébraux chez les lapins immunisés par ces homogénats de tissu nerveux [215]. L'association entre les Ac spécifiques d'Ag et la pathologie semblait indiquer que le processus de démyélinisation pouvait être provoqué par une réponse immunitaire, spécifique du tissu. Pour évaluer cette hypothèse, plusieurs groupes de recherche ont utilisé une combinaison d'émulsion cérébrale, d'huile de paraffine et de *Mycobacterium tuberculosis* inactivé par la chaleur, les deux derniers composants ayant la capacité de stimuler de manière non spécifique le système immunitaire (Table 3.1). Cet adjuvant, aujourd'hui connu comme adjuvant complet de Freund (*Complete Freund's adjuvant*, CFA), a été décrit pour la première fois par J. Freund au début des années 1940 [216]. Ces recherches ont permis de mettre en évidence que l'utilisation de CFA facilite l'induction de la pathologie. En effet, une seule injection du matériel protéique cérébral et de l'adjuvant suffit à obtenir une EAE. Dans les années 1950, la co-injection de toxine pertussique a permis d'améliorer l'efficacité de l'induction de l'EAE. Classiquement, le mécanisme par lequel la toxine pertussique facilite le développement de l'EAE est attribué à sa capacité à augmenter la perméabilité de la BHE. La toxine aurait également des effets pléiotropes sur différents composants du système immunitaire (Table 3.1) [217-219].

Table 3.1 : Composants actifs de l'adjuvant et leur rôle dans l'induction de l'EAE

Composant	Description	Action
Adjuvant incomplète de Freud (IFA)	Huile de paraffine et agents tensio-actifs	<ul style="list-style-type: none"> • Sécrétion du TNF-α dans les ganglions lymphatiques [220, 221] • Production des radicaux libres [220] • Perméabilisation de la BHE [222]
Muramyl dipeptide (MDP)	Peptidoglycane de la paroi bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation de l'hématopoïèse par la sécrétion du MC-GSF [220] • Recrutement des précurseurs macrophagiques vers la rate et prolifération de cellules souches dans la moelle osseuse [223]
Lipoarabinomannas (LAM)	Peptidoglycane de la paroi bactérienne	<ul style="list-style-type: none"> • Agoniste du TLR-2 exprimés par les phagocytes mononucléés [220] • Induction de la sécrétion d'IL-1, TNF-α, GM-CSF, IL-6, IL-10, IL-8 et CCL-7 (MCP-3)¹ [224] • Induction de la sécrétion du CCL-2 (MCP-1), CXCL-1 (KC) et iNOS² [225]
Heat shock proteins (HSP)	Chaperon	<ul style="list-style-type: none"> • Activation du TLR-4 des MPC et induction d'un signal de type LPS³
Oligonucléotides CpG	ADN bactérienne non-méthylé	<ul style="list-style-type: none"> • Stimulation du TLR-9 et sécrétion des cytokines par les cellules activées [226] • Maturation et activation de CPA [226] • Activation de lymphocytes T [226]
Toxine pertussique	Toxine bactérienne de type A-B	<ul style="list-style-type: none"> • Prolifération lymphocytaire [227] et induction d'une réponse immunitaire spécifique d'Ag [228] • Synthèse d'IgG1 et IgE [229] • Activation des cellules dendritiques par la reconnaissance du TLR-4 [230] et induction de l'expression de molécules de co-stimulation (CD80, CD86 et CMH de type I et II) [228, 231] • Induction de cytokines pro-inflammatoires [228] • Perméabilisation de la BHE [232]

Mycobacterium tuberculosis

¹ Induction obtenue avec de cellules sanguines mononucléées périphériques (PBMC) *in vitro* ; ² Induction obtenue avec de macrophages murines *in vitro* ; ³ HSP60 humaines.

L'EAE présente de grandes similitudes avec les maladies humaines démyélinisantes, en particulier avec la sclérose en plaques et les encéphalomyélites virales [233]. Les caractéristiques principales et les modalités évolutives, décrites par R.D. Adams en 1952, sont communes [234]. Elles sont caractérisées par (i) la destruction de la gaine de myéline, (ii) la présence d'Ig dans le tissu cérébral et le LCS des animaux, (iii) la présence de lésions multiples au sein du SNC majoritairement localisées dans les zones périvasculaires du parenchyme cérébral et de la moelle épinière.

Différents éléments du SNC sont impliqués dans l'induction de l'EAE. Tous les intérêts se sont cependant rapidement focalisés sur les Ag associés à la myéline dans la mesure où la démyélinisation représente une des principales caractéristiques histopathologiques de la pathologie [235]. En 1962, R.H. Laatsch et ses collaborateurs ont travaillé directement sur des extraits de myéline purifiés. L'incidence de la maladie chez les animaux a alors été multipliée par cinq. Une déplétion en composés lipidiques de la myéline associée à une extraction protéique leur a permis de purifier la protéine basique de la myéline (MBP). L'immunisation des animaux directement avec la MBP se révéla encore plus efficace que lors de l'utilisation de la myéline complète [236]. Le fractionnement des homogénats de tissu nerveux a mené à l'identification non seulement de la MBP, mais aussi d'autres protéines telles que la glycoprotéine de la myéline oligodendrocytaire (MOG) ou la protéine protéolipidique de la myéline (PLP) [237, 238]. Par la suite, les techniques de fragmentation enzymatique ont permis d'identifier plusieurs peptides de protéines de la myéline dont l'activité encéphalitogène varie en fonction de l'espèce et du fond génétique de l'animal utilisé. L'usage de souris transgéniques a confirmé l'importance de la région génique du complexe H2 comme zone contrôle de cette réponse encéphalitogène [239].

III.B.2 Différents modèles d'EAE

De nombreux modèles d'EAE ont été développés dans le but de « mimer » les divers aspects cliniques et anatomopathologiques de la SEP. Les modèles d'EAE les plus couramment utilisés sont des modèles murins, en raison de la facilité d'accès des sondes disponibles pour l'analyse de ce modèle. L'induction active d'une EAE chez la souris est un protocole standardisé qui consiste en une injection d'un peptide encéphalitogène de protéines de la myéline (MOG, PLP ou MBP) en émulsion dans du CFA associée à une ou deux injections de toxine pertussique. La phase de latence, le mode évolutif de la maladie (forme à

rechutes, forme progressive) et les aspects histopathologiques varient en fonction de la souche de la souris et du peptide utilisés. Globalement, les manifestations cliniques vont d'abord se traduire par une perte de poids. Les animaux vont, par la suite, développer une paralysie progressive qui peut aboutir à une tétraplégie. Au laboratoire nous avons développé deux modèles murins. Ils impliquent l'utilisation de peptides de la MOG (pMOG₃₅₋₅₅) ou de la PLP (pPLP₁₃₉₋₁₅₁) testés chez des souris de souches C57BL/6 (H2b) et SJL/J (H2s) respectivement.

Le **modèle pMOG₃₅₋₅₅ C57BL/6** présente une évolution clinique chronique progressive non rémittente chez la souris de fond génétique H-2b [240]. La MOG, initialement décrite sous l'appellation M2, est une glycoprotéine localisée à la surface de la gaine de myéline dans le SNC [237], qui n'est pas retrouvée dans le système nerveux périphérique (SNP) [241]. Elle représente un marqueur de maturation oligodendrocytaire. Ce composant mineur de la myéline (0,01 à 0,05 % des protéines) a cependant été identifié comme un auto-Ag clé impliqué dans le développement des lésions démyélinisantes de l'EAE [242]. Le caractère encéphalitogène de la MOG est lié à son accessibilité pour les auto-Ac (localisation extracellulaire de son domaine de type Ig, et expression sur la lamelle externe de la gaine de myéline).

Le **modèle pPLP₁₃₉₋₁₅₁ SJL/J** présente une évolution clinique récurrente-rémittente chez ces souris de fond H2s. La première poussée survient entre le 12 au 14^{ème} jour après immunisation. Elle est suivie d'épisodes récurrents, dans la plupart des cas plus modérés que la première poussée. Dans certains cas, on peut observer la mise en place d'un état chronique. Le modèle PLP est un modèle couramment utilisé [243]. La protéine transmembranaire PLP a été identifiée en 1951 par l'équipe de J. Folch et M. Lees [238]. Chez les mammifères, elle est fortement exprimée dans la substance blanche du SNC, où elle constitue plus de 50 % des protéines de la myéline. La PLP est synthétisée par les oligodendrocytes du SNC et par les cellules de Schwann du SNP, en faible quantité cependant. Cette protéine est impliquée dans la compaction et la stabilisation de la myéline, dans la maturation et survie oligodendrocytaire. Elle joue un rôle non négligeable au cours des stades précoces du développement neuronale [244].

L'utilisation de ce modèle animal a permis d'approfondir les connaissances sur la physiopathologie de la SEP, et spécialement d'explorer la place du SI dans le développement des événements pathologiques. Cependant, le modèle EAE a des limites et n'est pas capable de reproduire toute la complexité physiopathologique de la SEP. En effet, la SEP est une

maladie spontanée d'origine inconnue à ce jour, alors que l'EAE est induite artificiellement par la sensibilisation active avec des antigènes du SNC. De plus, dans la plupart des protocoles, de puissants adjuvants immunologiques sont nécessaires pour induire la maladie, ce qui n'est bien sûr pas le cas dans la SEP. Ceci pose la question de l'implication de l'immunité innée dans la SEP. Cette question sera abordée dans le chapitre suivant. En dépit de ces limites, les données expérimentales basées sur l'EAE ont permis d'aider au développement de nouveaux traitements et à la compréhension de leur mécanisme d'action comme l'acétate de glatiramer (un mélange aléatoire d'alanine, acide glutamique, lysine et tyrosine qui agit sur les processus de signalisation membranaire) [245], la mitoxantrone (un agent cytotoxique et immunosuppresseur antinéoplasique) [246] ou le natalizumab (un Ac monoclonal humanisé spécifique pour la sous-unité $\alpha 4$ de l'intégrine VLA-4) [247]. Ces différentes molécules sont actuellement utilisées en pratique courante chez les patients atteints de SEP.

III.C. L'immunologie de la SEP

III.C.1 Rôle de l'immunité innée

Plusieurs cellules de l'immunité innée participent au développement de la SEP. Elles peuvent être présentes, comme cellules résidentes du SNC (les cellules gliales) ou peuvent migrer lors d'évènements pathologiques (cellules dendritiques, monocytes, mastocytes...). Elles peuvent aussi exercer leurs fonctions dans le compartiment périphérique.

Comme nous l'avons vu précédemment, la **microglie** et les **macrophages résidents** composent les cellules de l'immunité innée du SNC. Des données expérimentales et des études réalisées chez l'Homme ont montré que ces cellules activées contribuent au développement de la maladie par la sécrétion de molécules pro-inflammatoires (telles que le TNF- α ou le monoxyde d'azote), qui vont induire des dommages oligodendrocytaires. Ces cellules sont détectées au sein de lésions actives de sujets SEP-PP, en état d'activation persistante [248]. Leur fonction acquise de CPA participe aussi au développement des processus pathologiques de la SEP. L'implication du CMH de classe II et des molécules de co-stimulation conduit à la fois, à l'activation des lymphocytes T et B effecteurs [249-251]. L'expression accrue des récepteurs TLRs par la microglie et les macrophages joue aussi un

rôle important dans le développement de la maladie [252, 253]. Ces cellules vont activer d'autres cellules immunocompétentes de proximité mais aussi participer directement à la démyélinisation par la phagocytose des composants de la myéline qui a été préalablement dégradée [254]. Outre le risque d'un entretien inapproprié de la présentation antigénique des produits de la myéline, ce phénomène va aussi favoriser la libération des produits réactifs toxiques de l'oxygène et des myéloperoxydases qui sont capables d'endommager les neurones [255]. L'environnement cytokinique pro-inflammatoire va aussi induire la sécrétion de la molécule TWEAK (*TNF-like weak inducer of apoptosis*) par les cellules microgliales. Cette molécule provoque la dégradation de la gaine de myéline, l'endommagement neuronal et l'altération endothéliale au sein des lésions corticales [256]. Dans le modèle animal, l'induction de l'EAE entraîne la sécrétion d'IL-17A par la microglie et les macrophages ainsi que la surexpression de son récepteur par ces mêmes cellules. Cette activation cellulaire autocrine conduit à l'augmentation de la production d'IL-6, de MIP (*Macrophage inflammatory proteins*), de monoxyde d'azote, de molécules d'adhésion qui participe à l'exacerbation observée de la pathologie [257].

D'autres cellules de l'immunité innée, non-spécifiques du SNC, telles que les **cellules dendritiques** participent au développement de la maladie. Ces cellules sont rarement détectées dans le parenchyme cérébral en conditions physiologiques, elles sont cependant retrouvées dans certains compartiments très vascularisés comme les méninges et le plexus choroïde [258, 259]. Parmi les très nombreuses sous-populations de cellules dendritiques aujourd'hui individualisées, deux sous-types sont présentes en faible quantité dans le LCS des sujets sains : les cellules dendritiques myéloïdes ($Lin^- CD11c^+$) et plasmacytoïdes ($Lin^- CD11c^- CD123^+$) [260]. À ce jour, seules quelques études ont mis en évidence le rôle éventuel des cellules dendritiques dans la physiopathologie de la SEP, indépendamment de la fonction de la microglie et des macrophages résidents. Les cellules dendritiques sont activées et présentes en plus grand nombre dans le sang périphérique et le LCS des patients SEP [260, 261]. Les cellules dendritiques plasmacytoïdes peuvent être recrutées activement au sein des lésions et au niveau des leptoméninges [262]. Cependant, à ce jour, ces données ne permettent pas d'élucider leur rôle réel dans l'apparition et la progression de la maladie.

La maturation des cellules dendritiques dépend des nombreuses interactions, notamment celles avec les **cellules NK** (*Natural killer*) au cours des phases précoces de la réponse immunitaire [263]. Il a été mis en évidence que les cellules NK et les cellules dendritiques peuvent s'activer de façon réciproque par des interactions cellule-cellule et par

l'action de cytokines comme l'IL-2. Ce processus d'amplification facilite le développement des mécanismes lésionnels [264, 265]. Les interactions des cellules NK avec les lymphocytes T et B auto-réactifs [266] et l'effet cytotoxique tissulaire propre aux cellules NK (IFN- γ , TNF- α , perforines, granzymes) [267] peuvent aussi jouer un rôle important dans l'induction des maladies auto-immunes. *In vitro*, les cellules NK sont aussi capables d'induire l'apoptose neuronale [268], oligodendrocytaire [269], astrocytaire et microgliale [270, 271]. Cependant, la pertinence biologique de ces données dans la physiopathologie de la SEP et/ou de l'EAE reste discutée.

Certains composants de la réponse allergique, comme les **mastocytes**, peuvent aussi contribuer au développement des maladies autoimmunes. Ces cellules sont caractérisées par la présence des granules cytoplasmiques contenant différents médiateurs vaso-actifs et pro-inflammatoires. Ainsi, bien que l'histamine reste la plus connue par son implication dans les réactions allergiques, les mastocytes peuvent aussi produire des leukotriènes (LTB₄), des prostaglandines (PGE₂ et PGD₂), des protéases (tryptase) et des cytokines (TNF- α et l'IL-4). Ces données soulignent que le mastocyte, surtout connu comme « *starter* » de la réponse allergique, est aussi impliqué dans d'autres événements associés à la réponse immune. En effet, la maturation [272, 273], la migration [274] et la différenciation de cellules dendritiques [275, 276] peuvent être modulés par les médiateurs pro-inflammatoires et les molécules de co-stimulation (comme le CD28, les PD-L1 et PD-L2 ou le CD40L) exprimés par les mastocytes. Les souris déficientes en mastocytes (*c-kit^{W/W^v}*) vont développer une EAE plus tardive et présenter des signes cliniques moins sévères [277]. Les mastocytes pourraient être impliqués dans la pathogénèse de l'EAE par leurs diverses sécrétions cytokiniques qui contribuent à la prolifération (TNF- α , IL-23, IL-12) [278] et différenciation (TGF- β , IL-6, IL-1 β) [279] des lymphocytes T, notamment de polarisation Th17. Les différents ligands des TLR présents dans l'adjuvant ainsi que les peptides myéliniques encéphalitogènes utilisés conduisent à l'activation des mastocytes au cours de l'EAE [280]. Des travaux précédents de notre équipe a été montré que des agents bloquant l'histamine ou son récepteur entraîne des effets favorables lors du développement de l'EAE [281]. Chez l'Homme, des mastocytes sont retrouvés aux niveaux des lésions [282]. Des analyses génétique du profil d'expression de gènes au sein des zones lésionnelles ont montré une surexpression de plusieurs transcrits spécifiques des mastocytes [283]. La présence de niveaux élevés de tryptases dans le LCS de patients SEP suggère la mise en place d'une activation mastocytaire intrathecale au cours de la maladie [284].

Des lymphocytes impliqués dans l'immunité dite « intermédiaire » avec des récepteurs d'Ag peu diversifiés ou semi-invariants ont aussi été impliqués dans la pathologie. Une étude récente a montré que les **lymphocytes T $\gamma\delta$** participent au développement de l'EAE en inhibant les fonctions effectrices des cellules T régulatrices CD25⁺ Foxp3⁺. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ sont caractérisés par la présence d'un TCR $\gamma\delta$ non restreint par le système CMH. Ces lymphocytes sécrètent différentes cytokines telles que l'IL-17A, l'IL-21 et l'IL-22, capables d'induire une réponse inflammatoire [285]. Les lymphocytes T $\gamma\delta$ ont été caractérisés au sein des lésions de patients SEP [286]. Une expansion clonale de ces cellules activées est observée dans le LCS des patient [287] tout comme dans le sang périphérique [288]. Ces observations sont associées à une aggravation de l'activité de la maladie, mesurée par IRM [289]. Une fois activés, les lymphocytes T $\gamma\delta$ vont exprimer des protéines de choc thermique [290] et sécréter des perforines. Ces mécanismes seraient impliqués dans l'induction de l'apoptose oligodendrocytaire [291, 292].

Des données préliminaires ont aussi mis l'accent sur l'implication des **cellules NKT** dans le développement de l'EAE, notamment après l'activation des récepteurs membranaires par le ligand α -Galactosylceramide. Aujourd'hui un rôle modulateur des cellules NKT est surtout mis en exergue. Nous le développerons dans un chapitre ultérieur.

III.C.2. Rôle de l'immunité adaptative.

II.C.2.1. Les lymphocytes T

Historiquement, la SEP a toujours été considéré comme une maladie contrôlée par les lymphocytes T CD4⁺. En 1960, l'équipe de P.Y. Paterson démontre que le transfert adoptif de cellules provenant d'un homogénat de ganglions lymphatiques de rats immunisés avec un homogénat de moelle épinière conduit au développement d'une EAE chez des animaux naïfs [293]. Ce processus, maintenant connu comme induction passive d'une EAE, illustre, pour la première fois, la notion de réponse auto-immune spécifique de tissu. Dans les années 1980, l'obtention de clones des lymphocytes T et des expériences de transferts adoptifs des lymphocytes T Lyt1⁺, spécifiques d'Ag de la myéline, ont permis de démontrer que le **lymphocytes T CD4⁺** auto-réactif constitue un des acteurs principaux dans le transfert de la maladie [294, 295]. Ces résultats ont été, en partie, confirmés par des travaux réalisés chez la souris IL-12p40^{-/-}, résistante à l'induction de l'EAE. L'IL-12 est une cytokine nécessaire au

développement des lymphocytes T CD4⁺ de polarité Th1, sécréteurs des cytokines pro-inflammatoires (principalement l'IFN- γ , mais aussi l'IL-2 ou le TNF- α et - β). Les niveaux d'expression d'IFN- γ et d'IL-12 sont élevés dans le parenchyme cérébral aussi que dans le LCS des patients SEP et sont associés à la sévérité clinique de la pathologie [296]. L'IFN- γ et l'IL-12 induisent l'expression de molécules du CMH de classe I et II au sein du SNC et activent la production de chimiokines qui permettent le recrutement de macrophages et de monocytes. Ces derniers, une fois activés, vont favoriser une réponse pro-inflammatoire dans le SNC provoquant une perte neuronale [297, 298] qui peut être liée à un processus nécrotique ou pro-apoptotique. L'IFN- γ inhibe aussi le processus de rémyélinisation au sein des lésions [299]. De manière surprenante, l'inactivation du gène de l'IFN- γ ou l'inhibition de la différenciation Th1 par le blocage de la voie de STAT1 (*Signal transducer and activator of transcription-1*) provoquent une aggravation clinique de l'EAE [300, 301]. Ces résultats paradoxaux ont été expliqués après la découverte de l'IL-23. Cette cytokine est structurellement apparentée à l'IL-12 car la sous-unité IL-12p40 est commune à l'IL-12 (IL-12p40/IL-12p35) et à l'IL-23 (IL-12p40/IL-23p19). Les souris transgéniques *IL-12p40*^{-/-} et *IL-23p19*^{-/-} sont résistantes à l'induction de l'EAE alors que les souris *IL-12p35*^{-/-} sont sensibles [302, 303]. Par conséquent, l'IL-23, plus que l'IL-12, semble jouer un rôle fondamental dans le développement de l'EAE. L'IL-23 est une cytokine cruciale pour le développement de la sous-population lymphocytaire T CD4⁺, majoritairement sécrétrice d'IL-17A, d'IL-17F et d'IL-22, nommée lymphocytes T de polarité Th17 [304, 305]. La différenciation et l'expansion de cellules Th17 dépend de l'IL-23, mais aussi du signal « synchronisé » induit par le TGF- β , l'IL-6 (chez la souris), l'IL-1 et l'activité autocrine de l'IL-21 [306-309]. Les cellules Th17 peuvent ainsi contribuer aux processus inflammatoires dans l'EAE et la SEP à la fois par la sécrétion de cytokines pro-inflammatoires (IL-17A et IL-17F), mais aussi par la production des métallo-protéases, des chimiokines (CXCL-8) et par l'activation paracrine des cellules productrices de médiateurs inflammatoires ou de facteurs de croissance hématopoïétique GM-CSF (*Granulocyte Macrophage-Colony Stimulating Factor*).

Différents travaux témoignent du rôle délétère des lymphocytes Th17 dans la pathogénèse de la SEP. En effet, des lésions chroniques de patients SEP présentent des niveaux élevés d'IL-17A et d'IL-17F [283]. Chez l'animal, le transfert adoptif de cellules Th17 provoque une évolution clinique de l'EAE plus sévère que le transfert de cellules Th1 [310]. De plus, la neutralisation de l'activité de l'IL-17A diminue la sévérité de la maladie [311]. Récemment, une étude a mis en évidence qu'une sous-population des lymphocytes

Th17 productrice, à la fois, d'IFN- γ et d'IL-17A migre plus efficacement vers le SNC que des cellules ne produisant que de l'IFN- γ ou de l'IL-17 [312].

Ces données attestent du rôle non négligeable joué par les lymphocytes T CD4⁺ dans le développement de la pathologie. Elles sont confortées par la découverte du rôle des polymorphismes du CMH de type II chez certains patients SEP (voir section III.A.2). Plusieurs travaux ont démontré l'implication d'allèles du CMH de classe I, tel que le HLA-A3 (A*0301), dans la susceptibilité à la maladie [313]. Ces observations mettent en exergue le rôle des **lymphocytes T CD8⁺** dans la pathogénie de la SEP. En effet, et contrairement au modèle EAE, les patients SEP présentent trois à dix fois plus de lymphocytes T CD8⁺ que de lymphocytes T CD4⁺ dans leurs lésions actives [314-316]. La formation de ces lésions, mesurée par IRM, et le score EDSS (*Expanded Disability Status Scale*) du handicap des patients sont corrélés à la concentration sérique des cytokines sécrétées par les lymphocytes T CD8⁺. De plus, la plupart des lymphocytes présents dans le LCS des patients sont des lymphocytes T CD8⁺ mémoires, spécifiques d'Ag neuronaux comme la protéine basique de la myéline associée aux oligodendrocytes (*Myelin Associated Oligodendrocyte Basic Protein*, MOBP) [317]. Bien que quelques travaux aient contesté le rôle des lymphocytes T CD8⁺ dans les mécanismes de neurodégénérescence [318, 319], des auteurs ont démontré que ces lymphocytes peuvent endommager les neurones, les oligodendrocytes et accroît la perméabilité de la BHE par une activité lytique et apoptotique, par la sécrétion d'agents cytotoxiques (perforin et le granzyme B) ou par l'interaction de Fas avec son ligand, présent à la surface des cellules T CD8⁺ [320, 321]. La présence de cellules T CD8⁺ productrices d'IL-17 au sein des lésions actives a récemment été démontrée [322], cependant le rôle physiologique de cellules CD8⁺ IL-17⁺ reste à définir.

II.C.2.2. Les lymphocytes B

Les **lymphocytes B** ont été plus récemment reconnus comme une composante importante de la réponse immune dans la SEP. Dernièrement, l'utilisation du rituximab, Ac monoclonal anti-CD20 (Genetech, Rituxan®), chez les patients atteints d'une SEP-RR renforce la notion d'une implication des lymphocytes B dans la pathogénèse de cette pathologie. Le CD20 est une protéine transmembranaire exprimée à la surface de cellules B, mais absente des plasmocytes. L'administration de rituximab provoque une déplétion rapide

des cellules CD20⁺ par le processus de cytotoxicité cellulaire dépendant du complément [323]. Dans un premier rapport, l'administration de deux doses de Rituximab chez un patient SEP-RR a provoqué une déplétion effective dans le compartiment sanguin et le LCS durant six mois [324]. Un premier essai clinique de phase II sur des formes rémittentes a montré que ce traitement conduit à une amélioration clinique, une diminution de l'activité de la maladie à l'IRM et une diminution du nombre de nouvelles lésions [325]. Une étude plus récente au cours de laquelle les patients SEP-RR ont reçu quatre doses hebdomadaires de Rituximab a confirmé les résultats obtenus précédemment [326]. Ainsi, le traitement des formes rémittentes par déplétion lymphocytaire B semble être efficace. Cependant, il reste à découvrir comment les lymphocytes B contribuent à la physiopathologie de la SEP. Différentes fonctions de ces cellules peuvent être impliquées. Nous allons les détailler dans les paragraphes suivants.

- La coopération entre les lymphocytes T et B : le rôle des follicules ectopiques

Différents travaux ont révélé que certains lymphocytes B peuvent présenter plus efficacement l'Ag aux lymphocytes, que des CPA professionnelles. Dans ces circonstances, les lymphocytes B et T reconnaissent des motifs peptidiques propres au même Ag (aide *cognate* ou connexe) [327]. Cette fonction CPA des cellules B facilite l'amplification de la réponse immunitaire spécifique d'Ag. La coopération entre les cellules T et B induit la formation d'un CG. L'ensemble de ces données a été préalablement présenté dans le Chapitre 1. Des structures similaires à des follicules (présence des lymphocytes B et des FDC) ont été décrites chez la souris EAE [328] et au niveau des méninges de patients atteints d'une SEP-SP. La présence de ces structures lymphoïdes ectopiques a été associée à un début précoce et/ou une progression sévère de la maladie [329, 330]. Dans un premier temps, l'organogenèse des tissus lymphoïdes ectopiques serait orchestrée par l'action synchronisée de plusieurs signaux chimiotactiques et cytokiniques. Les tissus lymphoïdes se formeraient suite à l'expression de la lymphotoxine (LT) $\alpha 1\beta 2$ par les lymphocytes B activés, infiltrés dans les méninges [331, 332]. La LT pourrait alors stimuler l'expression des ligands de molécules d'adhésions au niveau de l'endothélium cérébral et ainsi favoriser le trafic leucocytaire vers le SNC [333]. La LT active aussi la différenciation de précurseurs de fibroblastes résidant dans le tissu conjonctif des leptoméninges en FDC, productrices de la chimiokine CXCL13 (*B-cell attracting chemokines-1*, BCA-1) (Illustration 3.2). Cette chimiokine va principalement initier le recrutement des lymphocytes B CXCR5⁺, population

B majoritaire dans les LCS des patients [334]. Le LCS de patients SEP-RR présente une concentration élevée de CXCL13, non détectable chez l'individu sain. Cette concentration est corrélée avec la production intrathécale d'Ig, à la présence des lymphocytes et à l'activité de la maladie (mesurée par IRM) [184]. Le recrutement des lymphocytes B est aussi contrôlé par la chimiokine CXCL12 (*Stromal cell-derived factor-1*, SDF-1), capable d'activer le recrutement des lymphocytes B, mais également d'autres cellules immunocompétentes CXCR4⁺ comme les monocytes, les cellules T ou les plasmablastes. À la différence de CXCL13, les neurones secrètent CXCL12 en conditions physiologiques [335]. Les astrocytes et l'endothélium vasculaire augmentent leur sécrétion de CXCL12 au cours d'un processus inflammatoire induit par l'activation des cellules T et la sécrétion d'IL-1 et du TNF- α . Une expression élevée de CXCL12 est observée dans le LCS de patients SEP-RR, ainsi qu'au niveau des lésions actives et inactives du SNC [334].

D'autres signaux homéostatiques semblent être impliqués dans la formation des structures lymphoïdes. La cytokine BAFF, indispensable au maintien du pool de cellule B (voir chapitre1), est exprimée par les astrocytes en conditions physiologiques, probablement pour maintenir l'immuno-surveillance du SNC. Toutefois, cette cytokine est surexprimée au sein des lésions lors de la SEP [336]. Dans un modèle d'EAE, l'induction de l'expression intracérébrale des chimiokines CXCL13 et BAFF accompagnerait de la formation de structures folliculaires ectopiques dans les méninges [328]. Cependant, le rôle pathogénique de BAFF est contesté car l'utilisation de l'atacipept (récepteur de BAFF et APRIL solubles) provoque une exacerbation de la maladie (<http://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00642902>).

- Le lymphocyte B comme source de cytokines

La lymphotoxine (LT) n'est pas la seule cytokine sécrétée par les lymphocytes B impliquée dans le développement de la SEP. En effet, les cellules B peuvent produire une gamme très diverse de cytokines, selon leur mode d'activation. Ces cytokines vont jouer un rôle déterminant dans la polarisation des cellules T (Th1, Th2 ou Th17). Parmi ces cytokines, on a identifié plusieurs types d'IL (IL-4, IL-12, IL-10, IL-12, IL-16 ou IL-23) mais aussi le TNF- α et l'IFN- γ , capables de déclencher l'activité macrophagique et d'inhiber les fonctions des cellules régulatrices [337, 338].

- Le rôle de la réponse humorale

Le rôle pathogène des lymphocytes B est historiquement lié à leur capacité à sécréter des auto-Ac. Une des caractéristiques de la SEP est la présence de bandes oligoclonales dans la LCS chez 95 % des patients [339]. La nature de ces bandes suggère que des cellules B ont subi un processus d'activation intrathécale dépendant d'Ag (expansion clonale). Il a été démontré que des lymphocytes B présents dans le LCS sont la source de ces Ig oligoclonales [340]. Cependant, la spécificité de la réponse intrathécale n'est pas clairement établie.

Réponse contre des Ag myéliniques

Les Ac anti-**MOG** ont fait l'objet d'un nombre considérable de travaux. La MOG est synthétisée par les oligodendrocytes. Cette protéine, nous l'avons vu, est localisée sur la membrane externe de la gaine de myéline, ce qui la rend plus accessible que les Ag intracellulaires comme la MBP ou la PLP [237]. Bien que plusieurs équipes aient décrit que le sérum et le LCS des patients SEP présentent une fréquence d'Ac anti-MOG augmentée [341], d'autres études ont démontré que la fréquence de ces Ac est similaire à celle observée chez des sujets présentant d'autres maladies neuro-inflammatoires ou chez les donneurs sains [342] [343]. Néanmoins, les techniques de détection utilisées dans ces études sont différentes, ce qui peut expliquer l'hétérogénéité des résultats. D'autres Ag de la myéline, tels que la **MBP**, la **PLP**, la **MAG** ou la **CNP** (*Cyclic nucleotide phosphodiesterase*), ont fait l'objet d'études. Là encore, les données restent controversées.

Réponse contre des Ag non myéliniques

Plusieurs équipes se sont aussi intéressées au rôle des Ag non-myéliniques. On peut citer la protéine de choc thermique **$\alpha\beta$ -cristalline**, qui présente une activité immunosuppressive. Des Ac dirigés contre cette protéine ont été observés dans le LCS des patients SEP et pourraient inhiber son rôle immunosuppresseur [344]. D'autres travaux ont mis en évidence la présence d'Ac dirigés contre des glycoprotéines axo-gliales, telles que la **contactin-2/TAG-1** (*Transiently-expressed axonal glycoprotein*) et la **neurofascine**, présente dans les nœuds de Ranvier [345, 346]. Chez le rat, l'EAE peut être induite par l'administration des cellules T spécifiques de la contactin-2/TAG-1 [346]. Ce résultat présente un intérêt important car la dégénérescence axonale est une caractéristique importante de la SEP, notamment en phase progressive.

Réponse contre des Ag viraux

D'autres études se sont focalisées sur les **Ag viraux**. Une infection virale pourrait être un agent non négligeable dans l'étiologie de la SEP. Elle pourrait expliquer le recrutement massif des cellules T CD8⁺ dans les lésions. À ce jour, plusieurs études se sont intéressées au rôle de l'**EBV** (voir section II.A.2). Ce virus est présent dans 90 % de la population mondiale. Les réservoirs principaux sont les lymphocytes B. Historiquement, ces organismes infectieux ont été considérés comme activateurs de la réponse autoimmune de la SEP, probablement par un mécanisme de mimétisme moléculaire suite à une « dispersion » ou « contagion » épitopique (*epitope spreading*) ou à une activation de type « bystander ». Cette théorie est soutenue par l'observation d'une réactivité altérée vis-à-vis de l'EBV chez des patients SEP [347, 348]. Une étude longitudinale a démontré que les titres d'Ac anti-EBV augmentent avant l'apparition de la maladie. Ces résultats suggèrent que l'infection est un événement précoce et non une conséquence de la maladie [349]. Il a aussi été décrit que les lymphocytes B et plasmablastes du parenchyme cérébral de patients SEP sont infestés par l'EBV [209]. Cependant, des analyses réalisées post-mortem ont démontré que l'infection par l'EBV n'est pas une caractéristique spécifique de la SEP [210]. Les techniques utilisées dans ces études sont controversées [350], le lien entre l'infection par EBV et la pathogénèse de la SEP continue à être débattu à l'heure actuelle.

III.D. Nouvelles approches thérapeutiques

Après l'emploi d'agents thérapeutiques dont les effets multiples sur le SI étaient mal maîtrisés (IFN- β , l'acétate de glatimère ou le mitoxantrone), des nouvelles molécules, ayant un ciblage plus précis (Ac monoclonaux ou autres), sont aujourd'hui disponibles. La terminologie des Ac monoclonaux a été définie en fonction de la nature et de l'origine le l'Ac [351]. Les cibles de ces biothérapies sont diverses et agissent à différents niveaux de la réponse immune. Elles peuvent neutraliser une ou plusieurs populations lymphocytaires (rituximab, anti-CD20 : déplétion des cellules B / alemtuzumab, anti-CD52 : déplétion des lymphocytes et monocytes) ou cibler une seule sous-population cellulaire (daclizumab, anti-CD25 : déplétion des cellules T activées). Ces Ac peuvent aussi bloquer la transmigration leucocytaire vers le SNC (natalizumab, anti- α 4) [352]. À ce jour, seul le natalizumab est utilisé comme traitement de fond chez des patients présentant une SEP-RR. Dans tous les cas,

l'administration intraveineuse de ces thérapies ne facilite pas leur emploi en pratique courante. L'émergence de thérapies orales pourrait représenter une perspective plus satisfaisante pour le patient. Parmi ces nouvelles thérapies potentielles, on évoque principalement des analogues de la sphingosine et de l'ATP. Les analogues de la sphingosine induisent une internalisation du récepteur de type 1 de la S1P1 dans les lymphocytes, ce qui provoque leur rétention dans les organes lymphoïdes secondaires, et bloque ainsi leur migration vers le SNC. Les analogues de l'ATP s'incorporent dans l'ADN des cellules en division. Ils facilitent la destruction des cellules T CD4⁺ et CD8⁺ et des cellules B [353].

L'introduction de ces nouvelles thérapies a permis de mieux comprendre l'implication du SI dans le développement de la SEP. Toutefois, à ce jour, ni l'immunosuppression ni l'immuno-modulation n'assurent un arrêt de la neurodégénérescence, donc de la progression de la maladie à long terme. Par ailleurs, une meilleure connaissance des mécanismes de régulation, de protection ou de réparation impliqués dans la physiopathologie devrait permettre d'envisager des nouvelles perspectives de traitements plus prometteuses.

IV. Les relations entre le système immunitaire et le système nerveux central : Régulation et réparation

IV. A. La réponse immune comme mécanisme régulateur

Le SI est dotée des différents systèmes cellulaires et moléculaires qui contrôlent l'activation et l'expansion clonale des cellules auto-réactives à potentialité pathogène. Ces mécanismes, impliquent des cellules régulatrices qui évitent ainsi le risque de développement des lésions dans les tissus et les organes. Ces cellules régulatrices interviennent à la fois dans l'immunité innée et adaptative.

IV.A.1. Rôle de l'immunité innée

Trois populations cellulaires sont particulièrement impliquées dans des mécanismes régulateurs : les cellules NK, les cellules NKT et les cellules dendritiques.

Il a été décrit que la déplétion des **cellules NK** exacerbe la sévérité clinique de l'EAE. Les auteurs de ce travail ont observé que ces cellules sont capables de lyser et d'inhiber l'activité pro-inflammatoire les cellules T auto-réactives [354]. Récemment, une étude a montré que la déplétion des cellules NK avant l'induction de l'EAE provoque un retard dans l'apparition de la maladie. En revanche, si la déplétion est réalisée après l'induction, l'évolution clinique n'est pas modifiée. Les cellules NK participeraient donc à la régulation de la réponse immunitaire au cours de la phase initiale de la maladie [355]. Le transfert adoptif des cellules NK chez les patients atteints de lupus systémique, de polyarthrite rhumatoïde ou de diabète de type 1 améliore aussi leur évolution clinique [356-358]. Chez l'Homme, les cellules NK sont classées en deux sous-groupes fonctionnellement et phénotypiquement différents : les cellules NK cytotoxiques ($CD56^{low} CD16^{bright}$) et les cellules NK productrices de cytokines ($CD56^{bright} CD16^{low}$).

Les cellules NK $CD56^{bright}$ sont aujourd'hui considérées comme une sous-population de cellules NK régulatrices. En effet, ces cellules, productrices de cytokines, ont été associées

aux phases de rémission de la SEP et à une diminution des lésions mesurées par IRM [359]. L'administration du daclizumab (anti-CD25) chez des patients SEP a permis de suggérer que l'activation et l'expansion de ces cellules NK CD56^{bright} impliquaient bien une signalisation dépendante de la chaîne α du récepteur à l'IL-2. Une fois activées, les cellules NK CD56^{bright} entrent en contact avec les cellules T activées pour inhiber leur expansion [360]. Une étude plus récente a montré que l'administration d'IFN- β 1a (durant 6 à 12 mois) augmente le nombre de cellules NK CD56^{bright} circulantes [361].

Les **cellules NKT** constituent une population cellulaire qui présente certaines caractéristiques des cellules NK et des lymphocytes T. Les **cellules NKT semi-invariantes** (iNKT) expriment à la fois le récepteur NK1.1 et un TCR restreint. Par exemple chez la souris, ce TCR est composé d'une chaîne α , constituée du réarrangement V α 14-J α 18, couplée à un nombre limité de chaînes β , notamment V β 8.2 ou V β 7. Contrairement aux lymphocytes T conventionnelles, elles reconnaissent les glycolipides présentées par le CD1d, une molécule structurellement apparentée au CMH de type 1, exprimée par différents types cellulaires comme les lymphocytes B de la ZM. Comme les cellules NK, le nombre de cellules iNKT est fortement réduit chez les patients SEP [362]. Contrairement aux données préliminaires, déjà évoqués, l'activation *in vivo*, de cellules iNKT par le ligand α -galactosylceramide induit une amélioration de l'évolution clinique de l'EAE en favorisant la différenciation des lymphocytes T de polarisation Th2 au détriment de la polarisation Th1 [363, 364]. Paradoxalement, ces cellules peuvent prévenir le développement de l'EAE en favorisant la polarisation Th1 et la sécrétion de l'IFN- γ [365]. Cette fonction régulatrice de cellules iNKT est principalement dépendante de la production d'IL-4 et d'IL-10. Cette dernière joue un rôle fondamental dans l'induction des lymphocytes T régulateurs [366]. L'IL-10, sécrétée par les iNKT, est aussi capable de favoriser l'activité tolérogène des cellules dendritiques immatures [367].

La principale population de cellules dendritiques tolérogène est constituée des **cellules dendritiques plasmacytoïdes** [368]. Contrairement aux cellules dendritiques myéloïdes, ces cellules peuvent en effet induire l'anergie ou l'apoptose des cellules T pathogènes et aussi favoriser la différenciation des lymphocytes T naïfs CD4⁺ et CD8⁺ en lymphocytes T régulateurs [369-371]. La fonction régulatrice des cellules dendritiques plasmacytoïdes semble être liée à l'activité enzymatique d'IDO (indoleamine 2,3-dioxygénase), sensible à l'action de l'IFN- γ et à l'activation des TLR [372, 373]. Récemment, il a été décrit que l'action d'IDO est essentielle à l'induction des lymphocytes T régulateurs et à l'inhibition de

la conversion des lymphocytes T naïfs en cellules Th17 [374, 375]. Cette fonction régulatrice est notamment liée à la production de kynurénine, un métabolite du tryptophane [376, 377].

IV.A.2. Rôle de l'immunité adaptative

Après la découverte des cellules T régulatrices qui ont généré des très nombreux travaux, des données nouvelles s'intéressent aujourd'hui à d'autres populations régulatrices, notamment les lymphocytes B.

IV.A.2.1. Les lymphocytes T régulateurs

Les lymphocytes T régulateurs (Tregs) sont les principaux responsables de la maintenance de la tolérance périphérique de l'immunité adaptative. La première population identifiée comme régulatrice de la réponse immune ont été les **lymphocytes Treg naturels** (nTregs). Ils constituent entre 5 et 12% du compartiment cellulaire T CD4⁺ et sont produits par le thymus comme une sous-population lymphocytaire T fonctionnellement mature et distincte des cellules T CD4⁺ naïves [378]. Contrairement à ces dernières, les cellules nTreg seraient sélectionnées positivement dans le thymus par la forte affinité de leur TCR vis-à-vis des auto-Ag [379, 380].

Les nTregs ont été initialement identifiés comme des cellules T activées du fait de l'expression du CD25. En fait, ces cellules expriment constitutivement ce marqueur [378, 381]. Des expériences de déplétion sélective et/ou de transfert adoptif ont permis de montrer l'implication des lymphocytes T CD4⁺ CD25⁺ dans le contrôle de l'EAE [382]. Par la suite, la fonction essentielle du facteur de transcription Foxp3 (*Forkhead box P3*) dans le développement des nTregs a été établie. Bien que Foxp3 puisse être exprimé par d'autres cellules T (autres Tregs et lymphocytes T CD4⁺ activées), il jouerait néanmoins un rôle crucial dans la maintenance de la fonction suppressive des nTregs [383, 384]. En effet, des mutations dans le gène *Foxp3* provoquent la survenue de diverses maladies à composante immunologique, telles que les polyendocrinopathies, les enteropathies, le syndrome d'immunodéficience liée au chromosome X (IPEX), les maladies inflammatoires du tube digestive, la dermatite allergique ou les infections [385, 386]. D'autres marqueurs des nTregs, d'expression membranaire, ont aussi été décrits, incluant notamment le GITR (*Glucocorticoid-Induced TNF Receptor*), l'OX40 (CD134), la L-sélectine (CD62L) et le

CTLA-4 (*Cytotoxic T-Lymphocyte Antigen 4*, CD152), mais aucun de ces marqueurs n'est réellement spécifique de cette population.

Les nTregs peuvent exercer leur fonction suppressive par contact direct avec d'autres cellules. Dans ce mécanisme, la molécule CTLA-4 pourrait jouer un rôle déterminant. Chez la souris comme chez l'Homme, elle est constitutivement exprimée par les nTregs [387, 388] et la déplétion sélective des nTregs CTLA-4⁺ induit des signes cliniques similaires à ceux développés par les souris déficientes en Foxp3 (lymphoprolifération, hyperproduction d'IgE et la survenue des maladies auto-immunes) [389]. La fonction principale de CTLA-4 semble être l'inhibition des signaux de prolifération induit à la suite de contact avec une CPA. En effet, CTLA-4 reconnaît les molécules de co-stimulation CD80 et CD86. Cet engagement du CTLA-4 va inhiber les processus de prolifération (mécanisme dépendants des phosphatases) initialement CD28-dépendante (mécanisme dépendants des kinases). Cette interaction active aussi l'expression et l'activité d'IDO, avec la production de kynurenines et de Foxo 3, un facteur de transcription impliqué dans l'expression de plusieurs cytokines régulatrices [390, 391].

Les mécanismes de régulation liés aux nTregs impliquent aussi la sécrétion de facteurs solubles comme l'IL-10 qui participe aux mécanismes de tolérance au niveau des muqueuses des tractus respiratoire et digestif [392, 393]. Outre la production des cytokines immunomodulatrices, les nTregs ont aussi la capacité de produire des perforines et des granzymes qui conduit à la lyse des cellules effectrices (CPA et lymphocytes T) [394]. Ces observations multiples et variées, indiquent que les fonctions suppressives des nTregs sont très diversifiées et complexes. Ces cellules assurent, en permanence, les processus de tolérance du soi et permettent aussi le maintien de l'homéostasie lymphocytaire. Une première étude réalisée chez les patients SEP a permis de constater que les nTregs présentent ici des altérations qualitatives car elles sont défailtantes dans leur fonction suppressive des lymphocytes T conventionnels activés [395]. Ces observations sont associées à une expression diminuée de Foxp3 [396, 397]. Cette expression ainsi que les fonctions effectrices des nTregs semblent se rétablir dans les phases tardives de la maladie (SEP-SP) [398]. D'autres travaux ont décrit une diminution quantitative des nTregs récemment émigrés du thymus (RTE-Tregs) dans la sang périphérique en fonction de l'âge des patients [399, 400]. En effet, il a été décrit une régression thymique plus rapide chez les patients que chez les témoins sains, ce qui provoque un déséquilibre homéostatique des lymphocytes T périphériques [401, 402]. De plus, chez les patients SEP, les RTE-Tregs présenteraient un répertoire TCR restreint qui perturberait leur fonction régulatrice [399]. Dans le LCS des patients SEP-RR un nombre augmenté des nTregs

a été observé [403]. En revanche, d'autres travaux ont constaté l'absence de cellules T Foxp3⁺ dans le parenchyme cérébral de patients SEP-RR [322]. L'hypothèse de la migration des nTregs dans le SNC de patients SEP reste aujourd'hui discutée.

Les fonctions régulatrices peuvent aussi être acquises, à la périphérie, par des lymphocytes T CD4⁺ naïfs. La conversion des cellules naïves en **lymphocytes T régulateur induits** (iTregs) ne se déroule pas au niveau du thymus mais dans les OLS. Elle dépend principalement du type et de la qualité des signaux adressés par les CPA aux cellules T [404-408]. Cette signalisation sera donc sous le contrôle des effets des facteurs solubles comme le TGF-β [409] et de la présence de faibles doses d'Ag [410]. Plusieurs populations d'iTregs ont été décrites selon leur phénotype et leur fonction. Les lymphocytes T naïfs CD4⁺ peuvent acquérir un phénotype (CD4⁺ CD25⁺ Foxp3⁺) et une fonction régulatrice comparable à celle des nTregs après engagement du TCR en présence d'IL-2 [411, 412]. D'autres populations d'iTregs n'expriment pas le facteur Foxp3. Elles sont dénommées Tr1 et Th3. Les lymphocytes Tr1 sont notamment caractérisés par la production d'IL-10 et du granzyme B. Ces lymphocytes sont faiblement réactifs aux signaux TCR. La présence d'IL-10 est nécessaire à leur prolifération *in vitro*. Chez l'Homme, l'engagement du TCR, impliquant le complexe CD3/CD46, et la présence d'IL-2 induit la différenciation des lymphocytes T naïfs en cellules Tr1. Les patients SEP présentent un défaut de production d'IL-10 par des lymphocytes Tr1 [413, 414]. Les lymphocytes Th3 sont caractérisés par la production de TGF-β, un inhibiteur de la prolifération des lymphocytes T effecteurs [415]. La différenciation de ces cellules est induite majoritairement au niveau du tractus digestif [416]. Elle nécessite la présence d'IL-4 et d'IL-10 mais surtout l'action du TGF-β (activation autocrine ?). Elle est inhibée par l'IL-12 [417].

Les populations nTregs et les iTregs sont des populations lymphocytaires T CD4⁺. Les processus régulateurs sont aussi assurés par des lymphocytes T CD8⁺. Parmi celles-ci les **lymphocytes T CD8⁺ naturels** (nTregs CD8⁺) ont été identifiés. Leur activation, après reconnaissance de l'Ag, induit généralement l'expression du facteur Foxp3 et les chaînes α ou β du récepteur à l'IL-2 (CD25 et CD122, respectivement). Les nTregs CD8⁺ régulent la réponse immunitaire par des contacts cellulaires [418], à l'exception des nTregs CD8⁺ CD122⁺ (caractérisés chez la souris) qui agissent par l'intermédiaire de l'IL-10 [419]. Les nTregs CD8⁺ possèdent les mêmes caractéristiques fonctionnelles que les nTregs CD4⁺, mais reconnaissent bien entendu des Ag restreints ici par le CMH de classe I [419]. Plus

récemment, une nouvelle population de nTregs CD8⁺ a été identifiée. Ces cellules sont capables de supprimer la prolifération et/ou la fonction des cellules T effectrices. Chez la souris, elles sont nommées nTregs CD8⁺ restreints au complexe Qa-1 [420], chez l'Homme, nTregs CD8⁺ HLA-G⁺ [421].

Les Tregs CD8⁺ peuvent aussi se développer en périphérie. Ils sont connus comme **lymphocytes T régulateur CD8⁺ induits** (iTreg CD8⁺). Les iTregs CD8⁺ constituent une population lymphocytaire très hétérogène. Ils représentent probablement différents stades de différenciation des lymphocytes T CD8⁺ [422-424]. Ces lymphocytes ont la capacité de supprimer la réponse immune en interagissant directement avec les CPA et les rendant ainsi tolérogènes [425]. Ils produisent aussi les cytokines régulatrices IL-10 [426] et TGF-β [427]. Des expériences de déplétion du compartiment T CD8⁺ chez la souris EAE ont permis de mettre en évidence la fonction régulatrice des lymphocytes T CD8⁺. Cette déplétion conduit à une exacerbation de l'évolution clinique de la pathologie [428, 429]. De plus, le transfert adoptif de Tregs CD8⁺ activés par la MBP induit une résistance à l'EAE contrôlée par le TGF-β [430]. Divers travaux ont décrit un nombre réduit des Tregs CD8⁺ chez les patients SEP [431, 432]. Une étude récente a permis de déterminer les principales fonctions effectrices des lymphocytes T CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ lors du développement de la SEP [433]. Ces cellules inhibent la prolifération et la sécrétion d'IFN-γ et d'IL-17 par les lymphocytes Th17 grâce à des contacts membranaires. Elles vont aussi altérer la fonctionnalité des cellules dendritiques en réduisant l'expression des molécules de co-stimulation et en induisant la différenciation des cellules dendritiques tolérogènes par activation de l'expression d'IDO [433].

IV.A.2.2. Les lymphocytes B régulateurs

L'existence d'une ou plusieurs sous-populations de **lymphocytes B régulateurs** (Bregs) a été évoquée par la première fois à la fin des années 1960 par des expériences de transfert adoptifs. Des animaux ayant reçu des injections des cellules d'origine splénique productrices d'Ac ont présentés une résistance à l'immunisation induite par le SRBC (*Sheep red blood cells*) [434]. Cependant, c'est dans les années 1990 que CA. Janeway et collaborateurs confirment l'existence d'une fonction régulatrice portée par les cellules B, en utilisant un modèle d'EAE induit par un peptide de la MOG chez une souche murine déficiente en lymphocyte B (souris μMT) [435]. Les auteurs ont observé que l'absence de lymphocytes B provoque une exacerbation de la sévérité de la maladie. Par la suite, il a été

démontré que la fonction régulatrice de lymphocytes B est liée à leur capacité à sécréter l'IL-10 [436]. En effet, le transfert adoptif de lymphocytes B sécréteurs d'IL-10 chez la souris μ MT immunisée conduit à une diminution de la sévérité clinique de l'EAE.

- Marqueurs phénotypiques des Bregs

À la différence des Tregs, la caractérisation phénotypique des Bregs reste controversée. Plusieurs travaux signalent en effet que les Bregs sont composés de plusieurs types de lymphocytes B. La production d'IL-10 constitue un aspect bien connu des cellules B B1 CD5⁺ présentes dans la cavité péritonéale [437, 438]. Cependant, différentes études indiquent que le phénotype des lymphocytes B producteurs d'IL-10 serait proche des lymphocytes B de la lignée B2 dite conventionnel (CD11b^{low} CD5⁻ IgD⁻), et non de la lignée B1 (CD11b^{low} CD5⁺ IgD⁻) (voir chapitre 1). En effet les Bregs ne se forment pas en l'absence d'IL-7. Par ailleurs, la sécrétion d'IL-10 est aussi une caractéristique des lymphocytes B de la ZM après stimulation par le CpG [439]. Il a également été décrit que la sous-population de cellules B transitionnelles, appelées T2-MZP (CD1d^{high} CD21^{high} CD23⁺ IgM⁺) est capable de sécréter de l'IL-10 et d'améliorer l'évolution clinique de l'arthrite à collagène [440]. En accord avec ces résultats, chez l'Homme, une population de lymphocytes B immatures régulateurs (CD24^{high} CD38^{high}) a été décrite. Ces cellules seraient défaillantes quantitativement et qualitativement dans le lupus systémique [441].

Bien que de nombreuses publications décrivent différentes populations régulatrices, des études plus récentes ont mis en évidence une sous-population splénique unique CD5⁺ CD1d^{high} comme source principale d'IL-10 du compartiment B. Ils sont communément appelés cellules B10. Ces cellules jouent un rôle déterminant dans l'initiation et le développement de l'EAE [442, 443]. Il est important de noter que les marqueurs phénotypiques des cellules B10 sont partagés par différentes sous-populations lymphocytaires B, telles que les lymphocytes B de la ZM, B1a, ou T2-MZP. Comme nous l'avons vu, ces cellules sont toutes capables de sécréter de l'IL-10. En conséquence, les cellules B10 seraient d'avantage l'expression d'une sous-population fonctionnelle plutôt que le témoin d'une filiation liée à un lignage. La caractérisation phénotypique des Bregs humains reste controversée. Comme chez la souris, la production d'IL-10 serait un élément déterminant permettant de classifier les Bregs chez l'Homme [444]. L'expression du marqueur CD5 témoignerait d'un état d'activation et non d'une spécificité propre à un lignage. De plus,

aucune donnée ne permet d'affirmer l'équivalence fonctionnelle entre le CD1c humain et le CD1d exprimé par les Bregs murins.

- Fonctions des Bregs

L'engagement du BCR, la coopération avec les lymphocytes T et l'activation des TLR [445, 446] va conduire à l'activation des Bregs qui vont alors exprimer différentes polarités fonctionnelles. La fonction la plus connue est leur capacité à sécréter l'IL-10. Cette cytokine est capable d'agir à la fois sur les lymphocytes T en inhibant la différenciation et la prolifération des lymphocytes T effecteurs (Th1, Th2 et Th17), et sur les monocytes/macrophages en limitant la présentation d'Ag et la sécrétion des médiateurs proinflammatoires [447]. L'IL-10 est aussi capable d'induire l'activation des Tregs. L'utilisation de différents modèles expérimentaux (l'EAE, l'arthrite à collagène ou la maladie inflammatoire du tube digestif) a permis d'identifier les Bregs producteurs d'IL-10 comme étant des cellules tolérogènes, capables de contrôler l'inflammation [442, 448, 449]. D'autres travaux expérimentaux ont aussi permis de mettre en évidence que les lymphocytes B présentent la capacité de sécréter du TGF- β [435, 450-452]. Cette cytokine a de multiples effets serait impliquée : (i) dans l'induction de l'apoptose des lymphocytes pathogènes Th1, (ii) dans la mise en place des mécanismes conduisant à l'anergie des lymphocytes T CD8⁺ (iii) dans l'inhibition de la fonction des CPA. Les Bregs auraient aussi la capacité à produire des Ac à fonction régulatrice, mais les mécanismes en cause restent mal connus [453].

Les Bregs peuvent aussi réguler la réponse immune par des interactions directes avec d'autres cellules. Ils présentent la capacité d'induire la prolifération et l'activation des Tregs Foxp3⁺ par l'engagement du CD40 [454, 455]. En accord avec ces observations, une autre approche expérimentale après invalidation du gène *CD40* a mis en évidence que les lymphocytes B CD40⁻ ne sont pas capables de réguler la réponse immune contrôlée par les lymphocytes T au cours d'un processus inflammatoire [456]. Les Bregs expriment le CD40L (CD154) [443]. Ainsi une boucle autocrine CD40-CD40L pourrait contrôler leur activation. L'interaction Treg/Breg est également contrôlée par les molécules de co-stimulation de la famille B7 (CD80 et CD86) [457-459]. Ainsi, chez la souris EAE, l'expression de CD86 semble être particulièrement indispensable à l'induction de l'activation et à la mobilisation des cellules Treg Foxp3⁺ dans le SNC [457].

IV.B. La réponse immune comme mécanisme de réparation tissulaire

Le processus de rémyélinisation consiste à restaurer les gaines de myélines des axones endommagées. Ce mécanisme de réparation est surtout sous le contrôle des précurseurs oligodendrocytaires [460, 461]. Ces évènements réparateurs sont caractéristiques de la SEP [462, 463]. Plusieurs travaux ont mis en évidence la participation du système endocrinien dans la production des précurseurs oligodendrocytaires [464]. Toutefois, nous allons voir que le SI est aussi impliqué dans les processus de rémyélinisation. Ces notions soulignent l'importance des échanges d'informations entre les systèmes neuro-immuno-endocriniens

La **microglie** est capable de sécréter différents médiateurs neurotrophiques après activation par le TNF- α et l'IL-1 β . Le BDNF (*Brain-derived neurotrophic factor*), l'IGF-1 (*Insulin-like growth factor-1*) et la NT3 (*Neutropin 3*) sont capables de promouvoir les processus de neurogénèse [465]. De plus, l'élimination des débris de la myéline par phagocytose est nécessaire à la régénération axonale [466]. Dans ce processus de phagocytose, le récepteur TREM-2 (*Triggering receptor expressed on myeloid cells-2*) joue un rôle déterminant pour la clairance des corps apoptotiques. L'utilisation d'un Ac anti-TREM2, qui bloque le récepteur et altère le processus de clairance, conduit à une exacerbation de la maladie, à une expansion des infiltrats cellulaires inflammatoires au sein du SNC et à une démyélinisation plus importante [467].

Les lymphocytes B peuvent aussi stimuler la rémyélinisation et la croissance neuronale par la sécrétion d'**auto-Ac naturels** (AAN), produits avant toute stimulation antigénique. Ces AAN ont un répertoire poly-réactif avec des BCR de basse affinité. Ils participent, à la fois, à la première ligne de défense vis-à-vis d'agent infectieux et à l'équilibre de la réponse immunitaire [468]. Les AAN réagissent physiologiquement contre des auto-Ags et interagissent entre eux (implication dans le réseau idioype/anti-idiotype). Les phénomènes de SHM sont très limités et la plupart des AAN sont d'isotype IgM. Il existe cependant des AAN d'isotype IgG ou IgA.

La propriété de rémyélinisation des AAN a été découverte grâce à des expériences développées chez les rongeurs infectés par le virus de Theiler, un modèle de maladie démyélinisante du SNC. Les animaux ayant reçu des injections de sérum d'autres animaux infectés présentaient une rémyélinisation extensive en comparaison avec des animaux ayant reçu une injection de sérum provenant d'animaux sains. Le premier Ac inducteur d'un

processus de rémyélinisation a été identifié à la fin des années 1990 et nommé « SCH 94.03 » (*Spinal Cord Homogenates 94.03*) [469]. Cet AAN d'isotype IgM, obtenu à partir des animaux immunisés avec des homogénats de moelle épinière, favorise une rémyélinisation complète dans 30 % des lésions. De plus, cet AAN provoque une diminution importante de la sévérité de l'EAE [469, 470]. Chez l'Homme, deux Ac dénommés « sHIgM22 » et « sHIgM26 » ont été caractérisés. Ils sont capables d'interagir avec les oligodendrocytes et de promouvoir la rémyélinisation [471]. D'après l'équipe de M. Rodriguez, le mode d'action des AAN n'impliquerait pas la participation des mécanismes immunomodulateurs [472] mais pourrait promouvoir une réparation en agissant sur les flux calciques intracellulaires [473].

Cette même équipe souligne que les AAN peuvent aussi agir sur la croissance neuronale. Au début des années 2000, ils ont identifiés deux autres AAN, « sHIgM12 » et « sHIgM42 » [474]. Les investigateurs ont utilisé le modèle expérimental induit par le virus de Theiler, qui conduit aussi à une dégénérescence axonale au cours de la phase chronique de la maladie [475] afin de démontrer les propriétés ces AAN à promouvoir l'extension des neurones.

V. Objectifs du travail : Intérêt de l'étude de l'homéostasie lymphocytaire B

La place du lymphocyte B et de la réponse humorale dans la physiopathologie de la SEP sont maintenant bien reconnues. Des travaux du laboratoire se sont particulièrement intéressés à l'analyse des modifications du répertoire B au cours de la maladie (étude des réactivités sériques par immuno-empreinte). Il a été observé une singularité des profils d'auto-réactivités sériques dirigés contre des Ag cérébraux. Ce résultat constitue une véritable « signature sérologique » qui distingue les patients SEP, d'autres situations neuro-inflammatoires et des sujets sains [476]. La caractérisation moléculaire des cibles discriminantes a permis de mettre en évidence une singularité de reconnaissance qui n'était pas totalement spécifique du SNC. Certaines cibles étaient en effet des Ag ubiquitaires [477].

Afin de mieux comprendre la signification de cette distorsion du répertoire B singularisant la SEP, l'évolution des profils d'auto-réactivités sériques a été étudiée séquentiellement dans un modèle d'EAE. Les analyses ont été effectuées chez des souris femelles SJL/J, avant et après induction d'une EAE par immunisation active avec le peptide encephalitogène PLP₁₃₉₋₁₅₁. Outre l'existence d'une auto-réactivité sérique naturelle dirigée contre les protéines présentes dans le SNC, il a constaté, comme attendu, que ces profils étaient distincts entre les groupes étudiés (EAE et contrôles) et au cours du temps Zephir 2006. Une étude complémentaire a confirmée cette notion de « plasticité du répertoire B ». En effet, une modulation de l'évolution clinique de l'EAE induite par des médiateurs antiallergiques et anti-inflammatoires s'est accompagnée d'une modification du répertoire associé à des évènements pathogènes ou protecteurs [281].

L'ensemble de ces données a permis de postuler qu'il existe une corrélation entre l'altération du répertoire B et l'évolution clinique de l'EAE ou de la SEP. Cependant, la signification physiopathologique de ces distorsions reste incomprise. En complément de l'étude du répertoire immun par l'analyse des Ac sériques, mon objectif a été d'évaluer le statut de l'homéostasie lymphocytaire B en comparant différents modèles.

Dans un premier temps, je me suis attachée à évaluer de manière séquentielle l'homéostasie des différentes sous-populations lymphocytaires B dans le **modèle expérimental** induit par la pPLP₁₃₉₋₁₅₁ sur une souche sensible (SJL/J, H2s) et une souche résistante (B10.S, H2s) à l'EAE. Les premiers résultats acquis dans ont mis en exergue l'importance des sous-populations potentiellement régulatrices le contrôle de la susceptibilité à la maladie.

Dans un deuxième temps, nous avons souhaité prolonger l'étude de l'homéostasie lymphocytaire B dans le compartiment circulant et intrathecal chez l'**Homme**. Cette approche a été réalisée à des stades précoces et évolués de la SEP chez des patients non traités et chez des patients ayant bénéficié de différents types de traitements.

RÉSULTATS

I. L'homéostasie lymphocytaire B et l'EAE

I.A. Analyse séquentielle des sous-populations lymphocytaires B au cours de l'EAE

Lors de précédents travaux réalisés au sein de notre laboratoire, l'analyse séquentielle de l'auto-réactivité sérique des IgG dirigée contre des Ag cérébraux chez la souris EAE a mis en évidence l'implication de la réponse humorale dans la régulation des processus à la fois pathogènes et protecteurs [281, 478].

Afin de mieux comprendre la signification de ces résultats, je me suis intéressée à l'étude des différentes populations de lymphocytes B dans les phases de rémissions/récupérations dans un modèle expérimental de SEP. Les données de la bibliographie nous ont permis de déterminer plusieurs sous-populations lymphocytaires B potentiellement régulatrices. Ainsi, les populations lymphocytaires B B1a, de la ZM et T2 sont aujourd'hui reconnues comme étant impliquées dans la régulation de l'EAE et d'autres maladies auto-immunes expérimentales [439, 440, 479]. À ce jour, ce sont surtout les lymphocytes B10 ($CD5^+ CD1d^{high}$) qui sont mis en exergue. Ils présenteraient en effet la capacité « exclusive » de sécréter de l'IL-10 [443]. Cependant, cette population semble plutôt traduire une polarité fonctionnelle induite qu'une filiation à un lignage spécifique. Il existe en effet un chevauchement phénotypique partiel entre la population B10 et les lymphocytes B B1a ($CD5^+ CD43^+$), de la ZM ($CD21^{high} CD23^- CD1d^{high} IgM^{high}$) et les T2 ($CD93^+ CD21^{high} CD23^+ CD1d^{high} IgM^{high}$). Il nous est donc apparu pertinent d'explorer la répartition des chacune de ces cellules : les populations lymphocytaires B de la ZM, B1 et T2. Afin de valider notre approche expérimentale, nous avons aussi analysé les modalités de distribution des Tregs Foxp3⁺. Cette approche a été utilisée comme analyse de référence.

Nous avons utilisé le modèle animal EAE pPLP₁₃₉₋₁₅₁ SJL/J (complexe H2s). En effet, après immunisation, ces animaux développent une pathologie caractérisée cliniquement par une évolution récurrente-rémittente de la maladie. L'intérêt de ce modèle réside donc dans le fait que l'évolution clinique des animaux est proche de celle observée dans 80% des cas chez l'Homme. Une des originalités de notre travail consiste en l'utilisation de la souche de souris

B10.S, congénique pour le complexe H2, mais résistante à l'induction de l'EAE par la PLP₁₃₉.

151.

Nous avons focalisé notre étude sur quatre phases critiques de la maladie, nommées S1, S2, S3 et S4. Aucun signe clinique n'est observé au stade S1 (J7), cependant il correspond à la période où les IgG sériques anti-PLP commencent à être détectés par ELISA. Le stade S2 coïncide avec la phase aiguë de la maladie (J14±1), le stade S3 correspond au début de la phase de rémission (J21±2) et le stade S4 à la phase de rémission tardive de la maladie (J28±1). Les souris récupèrent la quasi-totalité de leurs capacités motrices au cours de ce stade.

Deux sites d'analyse des lymphocytes B ont été privilégiés : la rate, qui constitue le site de développement périphérique principal des lymphocytes B à la sortie de la moelle hématopoïétique, et les ganglions lymphatiques cervicaux, qui représentent un carrefour entre le compartiment périphérique et le SNC.

L'analyse des sous-populations d'intérêt aux quatre stades stratégiques, dans la rate et les ganglions lymphatiques cervicaux, a révélé que les 3 sous populations lymphocytaires B d'intérêt (B de la ZM, B1a et T2) semble participer effectivement à la régulation de la réponse immune. Les lymphocytes B B1a exerceraient leur(s) fonction(s) régulatrice(s) avec les Tregs Foxp3⁺ au niveau des ganglions lymphatiques cervicaux. En revanche, dans la rate, le maintien de l'homéostasie des lymphocytes B de la ZM et T2 constituerait un facteur critique pour le développement de la maladie. Ces observations sont associées à une instabilité de la concentration de BAFF sérique chez la souris sensibles alors que la souche résistante montre une augmentation de la concentration de BAFF après immunisation. L'ensemble de ces résultats démontre qu'il existe un lien entre le contrôle de l'homéostasie lymphocytaire B, la réponse BAFF et la susceptibilité à l'EAE. Les méthodes utilisées et les résultats sont détaillés dans l'article #1.

I.A.1. Article #1 : Susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with altered B-cell subsets distribution and decreased serum BAFF levels

Sous press

Auteurs: Catalina Lee-Chang, Didier Lefranc, Julia Salleron, Christelle Faveeuw, Cécile Allet, Patrick Vermersch, Bénédicte Oxombre* et Lionel Prin*.

Journal: Immunology Letters

* Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.

I.B. Étude de l'expression d'IDO par les lymphocytes B spléniques murins

Ce travail a été réalisé par Catalina Lee Chang et Bénédicte Oxombre-Vanteghem, en collaboration avec le service de toxicologie du CHRU de Lille.

Les sous-populations lymphocytaires B de la ZM, B1a et T2 sont impliquées dans la régulation de l'EAE (Article#1). Cependant, les mécanismes tolérogènes engagés restent peu connus. Notre attention s'est portée sur rôle de l'indoleamine 2,3-dioxygénase (IDO) dans les processus de tolérance impliquant surtout les cellules dendritiques plasmacytoïdes (induction et stimulation des lymphocytes T régulateurs et inhibition des lymphocytes T pathogéniques). IDO agit sur le métabolisme de différentes molécules comme le tryptophane. Son expression est induite par l'action des IFN (principalement l'IFN- γ) et/ou des ligands TLR (notamment le CpG) présents au cours d'un processus inflammatoire (infectieux ou auto-immun). L'activation de cette enzyme va permettre l'activation de la voie de signalisation non canonique du facteur NF- κ B [480]. L'activation de IDO conduit donc à l'appauvrissement du milieu en tryptophane, un acide aminé essentiel [373] et à une inhibition de la prolifération des agents infectieux (bactéries, virus, parasites) et des lymphocytes T. L'ensemble des métabolites produits par IDO est connu sous le nom de kynurénines. Elles conduisent à l'inhibition de plusieurs composants cellulaires du SI [377, 481-484]. Outre les kynurénines, l'activation de IDO va aussi permettre la synthèse des IFN de type I qui présentent des capacités à générer un environnement régulateur. La combinaison des IFN de type I et des kynurénines va favoriser la différenciation des lymphocytes T CD4⁺ naïfs en Tregs (Figure 1) [485, 486].

Après induction, IDO est exprimé par différents types cellulaires ; cependant, son expression par les lymphocytes B reste inconnue. Les mécanismes de tolérance liés à l'expression d'IDO pourraient expliquer certaines fonctions régulatrices des cellules B.

Méthodologie

- Induction des cellules Hela par l'IFN- γ :

Les cellules Hela ont été maintenues en culture dans un milieu DMEM + Glutamax supplémenté avec 10 % de SVF et 1 % de pénicilline-streptomycine [487, 488]. Tous les réactifs proviennent de chez Gibco (Invitrogen). Les travaux ont été réalisés dans des plaques

24 puits. 10^6 cellules Hela ont été activées avec 2000 U/ml de la protéine recombinante IFN- γ (Sigma) pendant 24 heures. Les culots cellulaires et les surnageants ont été conservés à -80°C .

- Purification des lymphocytes B murins :

Les lymphocytes B ont été purifiés à partir de rates des souris femelles SJL/J ayant développé une EAE (sacrifice à J35). Des animaux témoin ont reçu des injections de PBS stérile. Après un broyage tissulaire mécanique [41], les lymphocytes B ont été purifiés par séparation magnétique (CD19 MicroBeads, Miltenyi Biotec). Les cellules ont été préservées à -80°C . Pour les animaux témoins, une partie des lymphocytes a été utilisée immédiatement après purification pour les analyses *in vitro*.

- Activation des lymphocytes B par le CpG :

Les lymphocytes B triés ont été cultivés dans du RPMI 1640 supplémenté avec 10 % de sérum de veau fœtal (SVF), 2 mM de L-Glutamine, 1 % de pénicilline-streptomycine, 50 $\mu\text{g/ml}$ de 2-Mercaptoéthanol et 20 $\mu\text{g/ml}$ de gentamycine [489]. Tous les réactifs proviennent de chez Gibco (Invitrogen). Les travaux ont été réalisés dans des plaques 96 puits. 2×10^5 lymphocytes B ont été activés avec 10 $\mu\text{g/ml}$ de CpG ODN 1826 (InvivoGen) pendant 18 heures. Les culots cellulaires et les surnageants ont été conservés à -80°C .

- Analyse de l'expression deIDO par western blot :

L'extraction protéique à partir des culots cellulaires a été réalisée selon un protocole déjà défini [488] Le dosage des protéines a été effectué par la méthode Bradford. 10 μg de protéines ont été séparées sur gel d'acrylamide 10-20 % Tris-Glycine (Invitrogen). Après transfert, les membranes de nitrocellulose ont été saturées avec du TNT + 5% lait puis incubées avec un Ac anti-humain/souris IDO (1/500, une nuit à 4°C ; Upstate, Millipore). Après plusieurs lavages avec du TNT, les membranes ont été incubées avec un anti-IgG de souris couplé à la peroxydase (1/5000, 1h à température ambiante, Sigma). Les membranes ont été révélées grâce au kit ECL (ECL Western Blotting détection, GE Healthcare).

- Dosage de la kynurénine :

La concentration de kynurénines a été mesurée dans les surnageant par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC) grâce à la collaboration avec le service de toxicologie du Centre Hospitalier Régional et Universitaire de Lille (Dr. Nicole Houdret, Pr. Michel Lhermitte).

Résultats

La lignée cellulaire tumorale Hela activée par l'IFN- γ a été utilisée comme contrôle positif de l'expression et de l'activation de IDO (Figures 2 et 3).

L'expression d'IDO par les lymphocytes B spléniques, après activation par le CpG, chez les souris saines et EAE, a été recherchée par western-blot. Les résultats montrent qu'IDO n'est pas exprimé par ces cellules quelle que soient les conditions d'immunisation (SJL/J-PBS ou SJL/J-PLP) (Figure 4). Les surnageants cellulaires ont tout de même été analysés par HPLC. Comme prévu, cette analyse a confirmé l'absence d'activité enzymatique (résultats non présentés).

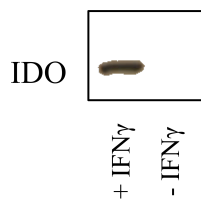
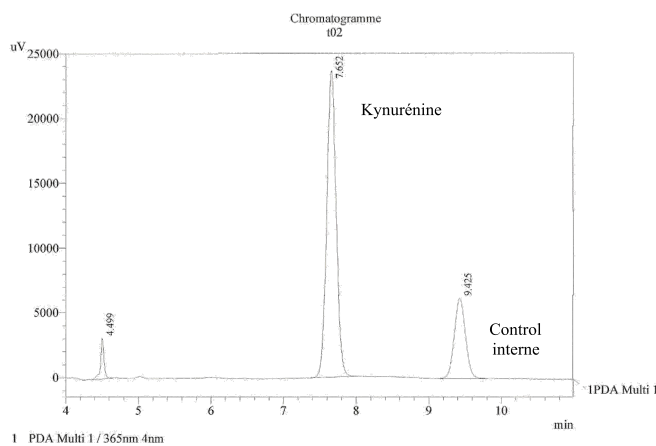


Figure 2 : L'activation des cellules HeLa par l'IFN- γ conduit à l'expression de IDO



Quantitative Results C:\LabSolutions\Data\kinurenine\002.1cd

ID#	composés	Tr	surfaces	Conc en mg/l
1	kinurenine	7.652	215696	22.13
2	ci	9.425	65589	0.00

Figure 3 : Dosage des kynurénines par HPLC

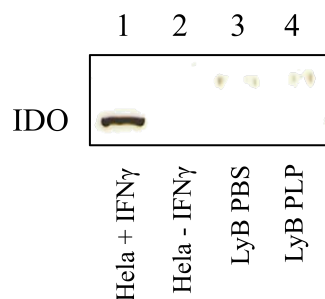


Figure 4 : IDO n'est pas exprimé par les lymphocytes B spléniques CD19⁺ des souris EAE après activation par le CpG. Des extraits protéiques réalisés à partir de cellules HeLa activées (Hela+IFN γ) ou non (Hela-IFN γ) par l'IFN γ ont servi de contrôles positif et négatif, respectivement (puits 1 et 2). Des extraits protéiques réalisés à partir de lymphocytes B provenant de la rate de souris témoins PBS (LyB PBS) ou EAE (LyB PLP), et stimulés par le CpG ont permis de mettre en évidence que ces cellules n'expriment pas IDO (puits 3 et 4). 10 μ g de protéines ont été déposées dans chaque puits.

II. L'homéostasie lymphocytaire B et la SEP

II.A. Implication des lymphocytes B transitionnels au cours des phases précoces de la maladie

L'utilisation d'un modèle animal de SEP nous a permis de confirmer que l'induction et le développement de l'EAE provoque une dérégulation de l'homéostasie lymphocytaire B. Les résultats obtenus nous ont encouragés à évaluer la répartition de différentes sous-populations lymphocytaires B chez l'Homme.

Environ 85 % des patients SEP développent un premier épisode clinique neurologique inflammatoire connu sous le nom de CIS (*Clinically isolated syndrome*) qui peut correspondre soit à une névrite optique rétrobulbaire, soit à une myélite, ou à une atteinte de la fosse cérébrale postérieure. La conversion de ce CIS en SEP (définie après l'apparition d'un deuxième évènement clinique) est toutefois imprévisible. Un travail récent, réalisé au sein de notre laboratoire a démontré l'existence de modification du répertoire B dès le stade CIS [490]. Cette analyse nous a permis de montrer que le profil d'auto-réactivité des sujets CIS était non superposable au profil d'auto-réactivité naturelle, mais était proche de celui décrit dans la SEP.

Après ces premières données, il apparaissait légitime d'examiner la distribution des différentes sous-populations lymphocytaires B sur des prélèvements sanguins de patients SEP-RR mais aussi CIS. Les lymphocytes B : transitionnels, naïfs, de la ZM et mémoires (IgM^{seule} et « switchées ») ont été analysés. Nos résultats montrent qu'il n'existe aucune perturbation homéostatique des lymphocytes B matures (naïfs, de la ZM et mémoires) chez les patients CIS et SEP-RR. Cependant, une réduction très importante du compartiment immature tardif circulant est observée. Contrairement aux résultats obtenus chez la souris EAE, les concentrations de BAFF sérique des patients CIS et SEP-RR ne sont pas altérées. Les modifications du nombre des lymphocytes B transitionnels circulants ne semblent donc pas être liées à un défaut de développement de ces cellules. L'analyse des molécules d'adhésion impliquées dans la transmigration leucocytaire et la caractérisation phénotypique des populations lymphocytaires B présentes dans le LCS, nous a conduit à envisager un éventuel passage des lymphocytes B transitionnels à travers la barrière sang-LCS lors des phases précoces de la maladie. Les résultats obtenus plaident pour une telle hypothèse. On

note par ailleurs qu'il existe un statut d'activation particulier de ces cellules qui migrent. La méthodologie ainsi que les résultats sont détaillés dans l'article #2.

II.A.1. Article #2 : Primed status of transitional B cells associated with their ability to cross the blood-CSF barrier in early phases of multiple sclerosis.

Accepté

Auteurs: Catalina Lee-Chang, Isabelle Top, Hélène Zéphir, Sylvain Dubucquoi, Jacques Trauet, Patricia Dussart, Lionel Prin* et Patrick Vermersch*

Journal : Clinical Immunology

* Les auteurs ont contribué de manière égale à ce travail.

II.A.2. Homéostasie lymphocytaire B des patients atteints d'une SEP et traités par le natalizumab et par l'IFN- β .

Nous avons observé que les lymphocytes B transitionnels des patients CIS et SEP-RR étaient capables de traverser la barrière sang-LCS (Article #2). Il était légitime de poursuivre cette étude en analysant la répartition des lymphocytes B circulants chez des patients SEP-RR traités par un Ac monoclonal anti- α 4 (natalizumab). Cet Ac empêche, en effet, la transmigration leucocytaire à travers l'endothélium, en situation inflammatoire du SNC [491]. Au total, 41 prélèvements sanguins des patients SEP-RR traités par le natalizumab ont été inclus dans notre étude (groupe NAT ; 27 femmes, 14 hommes, moyenne d'âge \pm écart-type : 39 ± 10 ans). Le traitement par le natalizumab provoque une augmentation du nombre de lymphocytes, et particulièrement des cellules B (Figure 5A). Ces résultats confirment les données de la littérature [492, 493]. Nous avons donc poursuivi notre étude en analysant la répartition de ces sous-populations lymphocytaires B en valeur relative et non en valeur absolue. Les proportions des lymphocytes B de la ZM et mémoire « switchés » du groupe NAT sont supérieures aux proportions du groupe contrôle (dénommé CTL dans l'article #2) et du groupe de patients SEP-RR non traités (dénommé MS dans l'article #2). La proportion des lymphocytes B naïfs est quant à elle réduite. Cependant, chez les patients traités la proportion des lymphocytes B transitionnels ne diffère pas de celle trouvée chez les sujets sains et non traités (Figure 5B).

Une cohorte de 17 patients SEP traités par IFN- β (groupe IFN ; 15 femmes, 2 hommes ; moyenne d'âge \pm écart-type : 39 ± 9 ans) a aussi été étudiée. À la différence des patients traités par le natalizumab, le groupe des patients traités par IFN ne présente pas de modifications du nombre total de lymphocytes, de cellules B et de sous-populations matures (Figure 6A et B). Cependant, les patients traités par IFN présentent un nombre (absolu et relatif) de lymphocytes B transitionnels inférieur à celui du groupe de contrôle d'une part et supérieur à celui des patients SEP non traités d'autre part (Figure 6C). L'analyse du compartiment lymphocytaire ainsi que les différentes sous-populations a été effectuée par la même méthodologie que celle décrite dans l'article #2.

L'incidence de ces résultats sera développée dans le chapitre discussion de cette thèse.

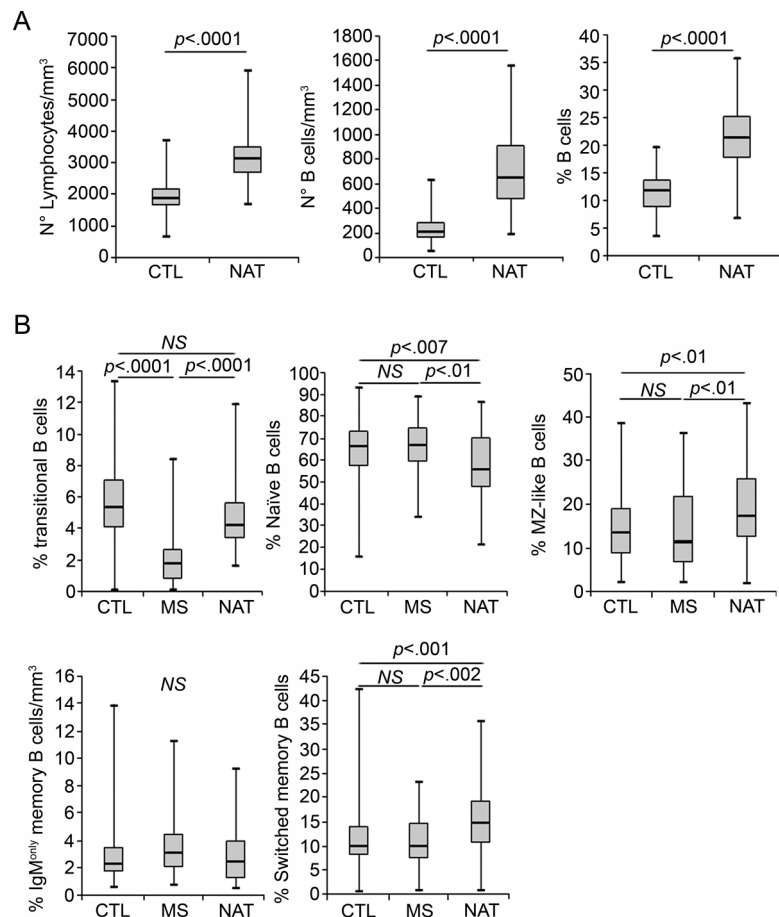
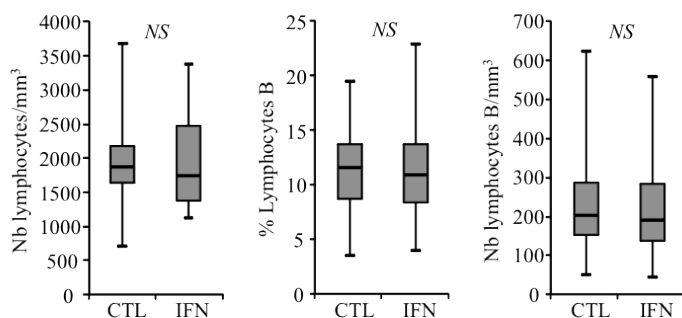


Figure 5 : Répartition lymphocytaire B des patients SEP-RR traités par le natalizumab.

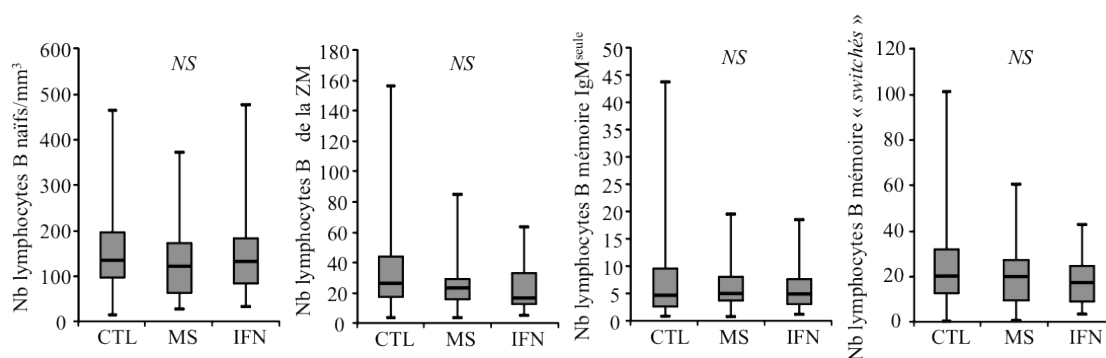
(A) Les patients SEP-RR traités par natalizumab (NAT, n=41) montrent une augmentation significative du nombre des lymphocytes totaux, et particulièrement du compartiment lymphocytaire B (nombre absolu et relatif). (B) Le groupe NAT montre des proportions comparables de lymphocytes B transitionnels aux proportions du groupe contrôle (CTL, n=76), et des proportions supérieures aux proportions du groupe des patients SEP-RR non traités (MS, n=46). Le groupe NAT présente des proportions de lymphocytes B de la ZM (*MZ-like*) et mémoires « switchés » supérieures et des proportions de lymphocytes B naïfs plus réduites que celles trouvées dans les groupes MS et CTL.

L'étude des sous-populations a été basée sur la totalité des lymphocytes B (région SSC/CD19). Les tests non paramétriques Kruskal-Wallis et Mann and Whitney ont été utilisés pour effectuer les analyses statistiques.

A Lymphocytes totaux et compartiment B



B Répartition des sous-populations lymphocytaire B matures



C Lymphocytes B transitionnels

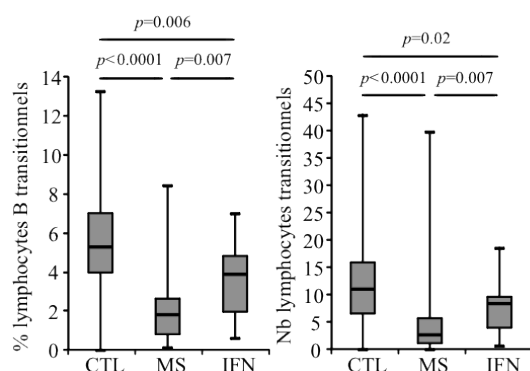


Figure 6 : Homéostasie lymphocytaire B des patients SEP traités par l'IFN- β . (A) Les patients SEP traités par IFN- β (IFN, n=17) présentent des nombres des lymphocytes totaux et de lymphocytes B comparables aux nombres du groupe control (CTL, n=76). (B) Aucun différence significative du nombre des sous-populations lymphocytaires matures n'est observée pour entre le groupe IFN, le group CTL et les patients SEP-RR non traités (MS, n=46). (C) Les nombres des lymphocytes B transitionnels du groupe IFN est inférieur à ceux du groupe CTL et supérieur à ceux du groupe MS.

L'étude des sous-populations a été basée sur la totalité des lymphocytes B (région SSC/CD19). Les tests non paramétriques Kruskal-Wallis et Mann and Whitney ont été utilisés pour effectuer les analyses statistiques.

II.B. Implications des lymphocytes B matures dans la CIS

Dans l'article précédent, nous avons décrit une expression accrue des intégrines par les lymphocytes B transitionnels lors d'une phase précoce de la maladie. Cette caractéristique pourrait faciliter la transmigration de ces lymphocytes à travers la barrière sang-LCS. Nous avons aussi démontré que l'intégrine $\alpha 4$ est surexprimée par toutes les sous-populations lymphocytaires B matures (naïfs, de la ZM et mémoires) lors du CIS. Nous avons mis en évidence une possible implication de ces observations dans l'évolution de la maladie car il existe une corrélation positive entre l'expression de l'intégrine $\alpha 4$ par les lymphocytes B et le nombre de lésions mesurées par les prises de gadolinium (IRM). Nous avons aussi montré que toutes les sous-populations lymphocytaires B matures sont présentes dans le LCS des patients CIS. La répartition de ces sous-populations est similaire à celle trouvée dans le LCS des patients atteints d'une autre maladie neurologique inflammatoire. La méthodologie ainsi que les résultats sont détaillés dans l'article #3.

II.B.1. Article #3 : B-cell subsets up-regulate α 4 integrin and accumulate in the cerebrospinal fluid in clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis onset

Auteurs: Catalina Lee-Chang, Hélène Z eфир, Isabelle Top, Sylvain Dubucquoi, Jacques Trauet, Lionel Prin* et Patrick Vermersch*.

Journal: Neuroscience Letters 487 (3) :273-7

* Les auteurs ont contribué de manière égale   ce travail.

DISCUSSION et PERSPECTIVES

La SEP est une maladie inflammatoire, démyélinisante, dégénérative du SNC, contrôlée principalement par les lymphocytes T CD4⁺ et T CD8⁺. Des données récentes soulignent aujourd'hui l'implication des nombreuses autres cellules résidentes ou migrantes dans le SNC. Parmi celles-ci, le lymphocyte B tient une place toute particulière en fonction de la multiplicité de ses propriétés, au carrefour de la réponse innée et de la réponse adaptative. D'ailleurs les thérapeutiques novatrices ciblées sur cette cellule montrent combien elle participe à l'immuno-modulation des événements physiopathologiques de la SEP. Dans notre travail de thèse nous avons pour objectif prioritaire de mieux appréhender les bases cellulaires et moléculaires de l'action de ces lymphocytes B.

Dans un premier temps, l'utilisation du modèle expérimental EAE (susceptible et résistant) nous a permis de mettre en exergue l'importance de l'équilibre homéostatique des sous-populations lymphocytaire B au cours de la maladie [41]. Les altérations observées de cette répartition lymphocytaire, que nous allons discuter, peuvent être mis en parallèle à la distorsion de la réponse humorale observée dans une étude précédente du laboratoire [478]. Nous nous sommes particulièrement intéressés à l'analyse des sous-populations lymphocytaire B potentiellement régulatrices, bien caractérisées phénotypiquement. Il s'agit des lymphocytes B1a, de la ZM et les T2 [439, 440, 479]. Une analyse de la distribution des Tregs Foxp3⁺ nous a aussi servi de population régulatrice de référence [494]. Ces sous-populations ont été analysées dans un modèle d'EAE caractérisé par une progression clinique à poussées, et dans la plupart des cas, suivi par une phase chronique progressive (modèle SJL/J-PLP₁₃₉₋₁₅₁).

L'évolution **clinique** de ce modèle présente des similitudes avec celle observée chez 80% des patients SEP (forme SEP-RR). En parallèle, une même étude a été réalisée avec la souche de souris B10.S, congéniques pour le complexe H2 avec la souris SJL/J, mais résistante à l'induction de l'EAE. En effet, les souris B10.S ne développent aucun signe clinique caractéristique de la maladie malgré la présence et l'expansion des lymphocytes T et B autoréactifs après immunisation avec le peptide pPLP₁₃₉₋₁₅₁. Il semble donc que dans le modèle B10.S-PLP₁₃₉₋₁₅₁, des systèmes de régulation se mettent en place alors qu'ils seraient défectueux dans le modèle SJL/J-PLP₁₃₉₋₁₅₁. L'équipe de V. Kuchroo a démontré d'ailleurs l'implication de ces processus de régulation, mais il a surtout porté son intérêt sur les lymphocytes T [382]. Les analyses **histologiques** des tissus nerveux (cerveau et moelle

épinière) de souris sensibles et résistantes ont mis en évidence une forte implication de la réponse inflammatoire dans le modèle SJL/J-PLP. En effet, le passage de cellules mononuclées du SI à travers la BHE est associé uniquement à la survenue des événements cliniques chez les souris SJL/J activement immunisées. Après cette validation clinique et histopathologique, l'étude **immunologique** devait se porter sur les sites d'analyse les plus appropriés. Notre choix s'est porté sur les ganglions cervicaux et sur la rate, en raison de la présence dans ces sites de lymphocytes B producteurs d'IL-10, cytokine considérée comme le marqueur principal des Bregs [436]. Nos premiers résultats suggèrent que les lymphocytes Treg Foxp3⁺ et B B1a pourraient exercer leurs fonctions régulatrices dans les ganglions cervicaux. Nous observons, en effet, une expansion et/ou un recrutement progressif de ces deux types cellulaires au cours de l'évolution de l'EAE. L'analyse comparée des ganglions cervicaux de souris sensibles n'ayant reçu que de l'adjuvant (SJL/J-Adj) et de souris immunisées résistantes à l'EAE (B10.S-PLP) nous a permis de constater qu'une augmentation du nombre de lymphocytes Treg Foxp3⁺ et B B1a est aussi présente chez les animaux ne développant aucun signe clinique. Cette présence est néanmoins moins importante et plus tardive que chez les souris développant une EAE. Ces résultats suggèrent que dans l'EAE les cellules régulatrices seraient qualitativement défectueuses. Ces résultats sont en accord avec des études antérieures qui décrivent les ganglions cervicaux comme un carrefour stratégique entre la réponse immune et le SNC [155]. Les résultats les plus significatifs concernant la dérégulation de l'homéostasie B dans les OLS, ont surtout été obtenue par l'étude des cellules B spléniques. Comme attendu, la rate est un bon reflet pour l'analyse de cette homéostasie.

Nos résultats montrent en effet la survenue d'événements critiques au niveau splénique lors du développement de la pathologie. L'induction de l'EAE chez les animaux sensibles provoque une altération profonde de l'homéostasie des populations B de la ZM et T2. Le nombre de lymphocytes B T2 est fortement réduit à l'acmé de la première poussée de la maladie. Le nombre des lymphocytes B de la ZM est aussi diminué lors de cette phase aiguë ainsi qu'au début de la phase de rémission. Ces résultats ne sont probablement pas la conséquence de l'action des adjuvants puisque le groupe SJL/J-Adj ne présente pas ces altérations. L'un des éléments qui pourrait expliquer la réduction du nombre des lymphocytes B T2 et de la ZM dans la rate pourrait être dépendant de BAFF. Celui-ci est, en effet, un des facteurs essentiels pour la survie et la différenciation des lymphocytes B transitionnels. Diverses études ont utilisé des modèles murins génétiquement modifiés afin de mettre en évidence que le blocage fonctionnel et/ou l'inhibition de l'expression de BAFF provoque un arrêt de la différenciation de la lignée B2 au stade T1 et, par conséquent, une réduction

importante du nombre de cellules T2 [88, 92, 495]. On constate, dans notre étude, la diminution de la concentration sérique de BAFF lors de la phase aiguë de l'EAE. La signification de cette diminution (défaut de production ou excès de consommation) reste indéterminée. On peut évoquer l'hypothèse d'un appauvrissement de l'environnement en BAFF lors du développement de l'EAE lié à une consommation excessive de ce facteur par les lymphocytes T auto-réactifs et/ou l'inhibition de la production de BAFF associé à l'action des corticostéroïdes produits après immunisation [496-498]. Ainsi, l'induction de l'EAE chez les animaux sensibles peut être associée, au moins en partie, à un dérèglement des signaux homéostatiques avec pour conséquence une altération des nombres de lymphocytes B T2 puis de la ZM. L'apparition d'une amélioration clinique chez les souris EAE est d'ailleurs associée à un rétablissement des taux sériques de BAFF et du nombre de cellules T2, comparables à ceux observés chez les animaux contrôles. L'ensemble de ces données montre une relation entre la « disponibilité de BAFF », le maintien de l'homéostasie B et la susceptibilité à l'EAE. Cette hypothèse est renforcée par les données obtenues chez les souris résistantes immunisées (B10.S-PLP). En effet, celles-ci présentent une augmentation des concentrations sériques de BAFF et du nombre des lymphocytes B T2 sept jours après l'immunisation. De manière intéressante, aucune altération du nombre des lymphocytes B de la ZM n'a été observée dans ce dernier modèle.

Cette première approche expérimentale a eu l'avantage de mettre en exergue le rôle protecteur des lymphocytes B de la ZM, T2 et B1a vis-à-vis du développement de l'EAE. Toutefois, ces travaux ne nous permettent pas de juger si la dérégulation homéostatique constitue un des éléments inducteurs de la maladie ou si elle est la conséquence de la survenue des événements pathogéniques. Par ailleurs la seule analyse phénotypique apparaissait insuffisante. Une approche fonctionnelle complémentaire s'avèrait donc indispensable. Plusieurs publications ont démontré que les lymphocytes Breg sont capables d'activer des lymphocytes Treg au cours de l'EAE et d'induire leur prolifération par l'intermédiaire de molécules de co-stimulation [457]. Les cellules dendritiques tolérogènes sont, elles aussi, capables d'induire l'activation et l'expansion des Tregs en partie grâce à l'activation de IDO [375]. Nous nous sommes particulièrement intéressé à IDO comme médiateur dans la fonction régulatrice des lymphocytes B. Nos résultats préliminaires indiquent que cette enzyme n'est ni exprimée, ni activée dans les lymphocytes B spléniques. Dans les limites de notre modèle d'étude, nous pouvons conclure que les mécanismes régulateurs des lymphocytes B ne paraissent pas liés à l'activité de cette enzyme. Des analyses fonctionnelles complémentaires doivent être poursuivies afin de mieux connaître

notamment l'implication de BAFF dans les mécanismes protecteurs. Ainsi les conséquences d'une inhibition de l'activité de BAFF chez les souris résistantes immunisées mériteraient d'être étudiés. Cette approche est importante dans les perspectives thérapeutiques. En effet, un rôle régulateur de BAFF pourrait expliquer l'échec de l'essai clinique de l'atacipept (récepteur soluble de BAFF) comme traitement contre la SEP (<http://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT00642902>). Une analyse comparative des potentialités fonctionnelles des différentes sous-populations lymphocytaires B entre les souches de souris sensibles et résistantes permettrait aussi à l'avenir de mieux juger de leur incidence dans les processus de contrôle des événements pathogènes ou régulateurs (polarité de production des cytokines, répertoire des Ac produits ?).

Les données obtenues à partir des modèles expérimentaux nous ont incités à poursuivre l'analyse de l'homéostasie lymphocytaire B chez l'Homme. Nous avons analysé les sous-populations lymphocytaires B circulantes, sans *a priori*, car le phénotype des Bregs humains est moins documenté que celui des Bregs murins. Grâce à des travaux développés précédemment au laboratoire, nous savions que les patients CIS et SEP-RR présentent des altérations du répertoire B [476, 490]. Il nous a donc semblé légitime d'analyser l'homéostasie lymphocytaire B notamment lors des phases précoces de la maladie. Les prélèvements sanguins de ces deux groupes de patients (CIS et SEP-RR) présentent une réduction très importante, en nombre absolu et relatif, des lymphocytes B transitionnels circulants. Plusieurs hypothèses ont alors été proposées.

Chez la souris nous savons que l'altération de l'homéostasie B semble être liée à une perturbation affectant la disponibilité en BAFF suite à l'immunisation. Dans un premier temps nous avons donc analysé les taux de ce facteur de croissance dans le compartiment sérique des patients. Nos résultats ont mis en évidence que la concentration de BAFF n'est perturbée ni chez les patients CIS ni dans le cas de SEP-RR (Figure supplémentaire 2 de l'article #2 ; [499, 500]). Il est donc peu probable que la distorsion du compartiment B immature circulant observée chez les malades soit liée à un défaut de production et donc de maturation des lymphocytes B.

L'hypothèse d'une domiciliation inappropriée perturbant l'équilibre des compartiments sang/tissu a été également évoquée. La mise en place du processus inflammatoire lors du développement de la maladie pourrait en effet conduire, suite à « l'ouverture » de la BHE, au recrutement des lymphocytes B transitionnels au sein du SNC. Ceci expliquerait le nombre réduit de ces cellules dans le compartiment sanguin. Dans un

premier temps, cette hypothèse a été examinée en analysant l'expression des diverses chaînes d'intégrins ($\alpha 4$, $\beta 1$ et $\beta 7$) impliquées dans les processus d'extravasation leucocytaire à travers un endothélium activé [177, 501]. Nous avons noté que les lymphocytes B transitionnels des sujets CIS et SEP-RR expriment fortement les chaînes $\alpha 4$ et $\beta 1$ à leur surface. Ces données suggèrent que ces cellules présentent un état de pré-activation particulier ou *priming*. Cette notion a été confirmée par le fait que ces patients présentent un nombre accru de lymphocytes B transitionnels CD80⁺ (molécule de co-stimulation, témoin d'activation B). L'ensemble de ces observations suggère que, chez les patients CIS et SEP, les lymphocytes B transitionnels « *primés* » auraient une capacité de transmigration endothéliale plus importante déjà lors des phases précoces de la maladie. Le SNC, en situation inflammatoire, pourrait alors être la cible tissulaire de leur domiciliation. La caractérisation de ces lymphocytes dans le parenchyme cérébral aurait pu confirmer notre hypothèse mais cette approche est difficilement envisageable. Pour une évaluation indirecte des événements intrathécaux, nous avons exploré le LCS de patients. Nos résultats montrent que, dans certains cas, les lymphocytes B transitionnels sont effectivement capables de traverser la barrière sang-LCS. Ce changement de domiciliation est corrélé à la réduction du nombre des lymphocytes B transitionnels dans le compartiment sanguin et à l'augmentation de l'expression du CD80 par ces cellules. Cette même observation n'a pas pu être faite lorsque l'on étudie des prélèvements de sang et de LCS de patients ayant développé d'autres maladies neuro-inflammatoires (*other inflammatory neurological diseases*, OIND). L'ensemble de ces données suggère que l'état de *priming* et l'accumulation dans le LCS des lymphocytes B transitionnels paraissent étroitement liés au processus d'inflammation intrathécale spécifique de la SEP. Notre hypothèse ne pourra être confirmée qu'après un suivi de l'évolution clinique de la cohorte de patients CIS étudiée. En effet, environ 80% de ces patients CIS évoluent vers une SEP cliniquement définie, 20% des ces patients développeront une OIND [490]. S'il s'avère que l'expression du CD80 et des intégrines par les lymphocytes B transitionnels est corrélée à une évolution vers une SEP, ces molécules pourraient être utilisées comme marqueurs d'intérêts prédictifs de la maladie. Une étude complémentaire a mis en évidence que l'expression de la chaîne $\alpha 4$ est accrue sur l'ensemble des populations B chez les patients CIS (Article #3). Cette surexpression globale n'est pas observée chez les sujets SEP. Elle constitue donc une caractéristique unique du CIS. De manière intéressante, l'expression de la chaîne $\alpha 4$ par les lymphocytes B totaux est corrélée à l'augmentation de l'activité de la maladie, mesuré par le nombre des lésions T1 rehaussées par le gadolinium (indice de la

perméabilité de la BHE) [502]. L'exploration du LCS des ces patients a permis de démontrer que toutes les sous-populations lymphocytaires B matures sont capables de traverser l'endothélium cérébral dès le stade CIS. La répartition de ces sous-populations est comparable à celle retrouvée dans le LCS des patients SEP et OIND [503, 504].

Toutes les données acquises mettent l'accent sur un état fonctionnel particulier des lymphocytes B transitionnels. Deux questions essentielles se posent à nous : (i) pour quelle raison ces cellules sont dans un état de *priming* ? (ii) quelle est la conséquence de cet état fonctionnel sur le devenir de cette population ? Nous avons vu que les lymphocytes B de la ZM murins ont aussi cet état de pré-activation, mais celles ci sont dans un environnement bien déterminé (phénomène de « *homing* » ou ecotaxie). Il reste aussi impératif de savoir si cet état de « *priming* » des lymphocytes B transitionnels participe à leur capacité à trans migrer à travers l'endothélium du SNC. Notre analyse des prélèvements sanguins de patient SEP traités par l'IFN- β permet de retenir une telle hypothèse. Bien que le nombre de lymphocytes B transitionnels de patients traités par l'IFN- β soit bas ; il est significativement supérieur à celui retrouvé chez les patients non traités. L'IFN- β réduit sélectivement le nombre de lymphocytes B CD80⁺, et cette réduction est corrélée à une diminution de la sévérité de la pathologie [505]. L'IFN- β a en fait des effets multiples. Il inhiberait la fonction CPA ainsi que le trafic lymphocytaire vers le SNC en agissant sur VCAM-1 [506]. Ainsi, ces données bibliographiques et nos propres résultats suggèrent un lien entre l'expression du CD80 et la transmigration lymphocytaire. Afin de mieux comprendre la signification biologique de nos données, différentes perspectives sont envisagées. Pour mieux juger du rôle de CD80 sur les processus de migration des lymphocytes B, son expression sera analysée sur les cellules transitionnelles domiciliées dans le LCS des patients CIS et SEP-RR. Par la suite, nous tenterons de mieux définir les conditions requises pour expliquer cette expression inappropriée de CD80 sur ces cellules transitionnelles. Dans cette perspective nous évaluerons le rôle soit de médiateurs circulants (ex : cytokines et/ou chimiokines) soit de l'engagement des récepteurs de l'immunité naturelle (ex : rôle des TLRs). Ces études s'inscrivent dans le cadre d'un projet post-doctoral (Dr. Aurore Sarazin).

Les raisons précises d'une domiciliation inappropriée des lymphocytes B transitionnels au sein du SNC méritent aussi d'être approfondie. Pour tenter de répondre à cette question nous avons analysé l'homéostasie lymphocytaire B chez des patients SEP-RR traités par le natalizumab (Ac anti- α 4). Bien que les proportions de lymphocytes B transitionnels soient ici normales et non réduites, l'augmentation des lymphocytes totaux, plus

particulièrement des cellules B, dans le compartiment sanguin rendent l'interprétation de nos résultats difficile. Cette question demeure toutefois importante car nous pouvons nous interroger sur les conséquences de la présence des cellules B transitionnelles dans le SNC. Ainsi, ce passage des lymphocytes B au cours de la SEP ne serait plus restreint à une ou quelques populations impliquées dans l'immuno-surveillance, mais serait beaucoup plus permissive. Les lymphocytes B transitionnels peuvent à la fois être sensibles à des signaux dépendants d'Ag (signalisation BCR) ou à d'autres signaux provenant de l'environnement (importance des signaux liés à des médiateurs solubles ou à des récepteurs PPRs ?). La qualité de ces signaux aura un rôle déterminant sur la polarité fonctionnelle du B dans ce nouvel environnement (signaux de survie, de prolifération, d'apoptose ?). À la différence des cellules B matures qui ont subi des processus de sélection, un grand nombre de lymphocytes B transitionnels circulants reste auto-réactif. Les mécanismes de tolérance impliqués au sein du SNC sont encore mal définis. La production accrue de CXCL13, CXCL12 et de BAFF dans le SNC lors de la SEP [336] et la présence de follicules ectopiques au sein des lésions chez certains patients SEP [329] pourraient faciliter la survie et maturation intrathécale de ces lymphocytes B transitionnels. Ces lymphocytes pourraient ainsi développer une néo-réactivité intrathécale spécifique. La confirmation de cette hypothèse nécessite l'analyse et la comparaison des profils de réactivités obtenus à partir de serum et de LCS de patients. Ces études s'inscrivent dans le cadre d'un projet de master 2 recherche (Émeline Duhin).

L'étude de l'homéostasie lymphocytaire B chez la souris et chez l'Homme, réalisée au cours de ma thèse, a contribué à améliorer la compréhension du rôle des différentes sous-populations lymphocytaires B dans la physiopathologie de l'EAE et de la SEP. Ils ont mis en évidence des anomalies phénotypiques et fonctionnelles des sous-populations lymphocytaires B. Les conditions de survenue de tels dysfonctionnements posent des nouvelles questions et font aujourd'hui l'objet des nouvelles perspectives de recherche au laboratoire.

RÉFÉRENCES BIBLIOGRAPHIQUES

- [1] G.X. Yang, Z. X. Lian, Y. H. Chuang, S. A. Shu, Y. Moritoki, R. Lan, K. Wakabayashi, A. A. Ansari, K. Dorshkind, S. Ikehara, M. E. Gershwin, Generation of functionally distinct B lymphocytes from common myeloid progenitors, *Clin. Exp. Immunol.* 150 (2007) 349-357.
- [2] C.V. Laios, M. Stadtfeld, T. Graf, Determinants of lymphoid-myeloid lineage diversification, *Annu. Rev. Immunol.* 24 (2006) 705-738.
- [3] T. Egawa, K. Kawabata, H. Kawamoto, K. Amada, R. Okamoto, N. Fujii, T. Kishimoto, Y. Katsura, T. Nagasawa, The earliest stages of B cell development require a chemokine stromal cell-derived factor/pre-B cell growth-stimulating factor, *Immunity.* 15 (2001) 323-334.
- [4] P. Papathanasiou, J. L. Attema, H. Karsunky, N. Hosen, Y. Sontani, G. F. Hoyne, R. Tunningley, S. T. Smale, I. L. Weissman, Self-renewal of the long-term reconstituting subset of hematopoietic stem cells is regulated by Ikaros, *Stem. Cells.* 27 (2009) 3082-3092.
- [5] K. Kikuchi, A. Y. Lai, C. L. Hsu, M. Kondo, IL-7 receptor signaling is necessary for stage transition in adult B cell development through up-regulation of EBF, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 1197-1203.
- [6] R.P. DeKoter, B. L. Schweitzer, M. B. Kamath, D. Jones, H. Tagoh, C. Bonifer, D. A. Hildeman, K. J. Huang, Regulation of the interleukin-7 receptor alpha promoter by the Ets transcription factors PU.1 and GA-binding protein in developing B cells, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 14194-14204.
- [7] R.P. DeKoter, H. Singh, Regulation of B lymphocyte and macrophage development by graded expression of PU.1, *Science.* 288 (2000) 1439-1441.
- [8] T. Maeda, T. Merghoub, R. M. Hobbs, L. Dong, M. Maeda, J. Zakrzewski, M. R. van den Brink, A. Zelent, H. Shigematsu, K. Akashi, J. Teruya-Feldstein, G. Cattoretti, P. P. Pandolfi, Regulation of B versus T lymphoid lineage fate decision by the proto-oncogene LRF, *Science.* 316 (2007) 860-866.
- [9] E. Bertolino, K. Reddy, K. L. Medina, E. Parganas, J. Ihle, H. Singh, Regulation of interleukin 7-dependent immunoglobulin heavy-chain variable gene rearrangements by transcription factor STAT5, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 836-843.
- [10] M. Fuxa, J. Skok, A. Souabni, G. Salvaggio, E. Roldan, M. Busslinger, Pax5 induces V-to-DJ rearrangements and locus contraction of the immunoglobulin heavy-chain gene, *Genes. Dev.* 18 (2004) 411-422.
- [11] T. Tsubata, M. Reth, The products of pre-B cell-specific genes (λ 5 and VpreB) and the immunoglobulin mu chain form a complex that is transported onto the cell surface, *J. Exp. Med.* 172 (1990) 973-976.
- [12] S. Pillai, D. Baltimore, The omega and iota surrogate immunoglobulin light chains, *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 137 (1988) 136-139.
- [13] H. Karasuyama, A. Kudo, F. Melchers, The proteins encoded by the VpreB and λ 5 pre-B cell-specific genes can associate with each other and with mu heavy chain, *J. Exp. Med.* 172 (1990) 969-972.
- [14] A.S. Lazorchak, M. S. Schlissel, Y. Zhuang, E2A and IRF-4/Pip promote chromatin modification and transcription of the immunoglobulin kappa locus in pre-B cells, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 810-821.
- [15] A.G. Rolink, J. Andersson, F. Melchers, Characterization of immature B cells by a novel monoclonal antibody, by turnover and by mitogen reactivity, *Eur. J. Immunol.* 28 (1998) 3738-3748.

- [16] H. Wardemann, S. Yurasov, A. Schaefer, J. W. Young, E. Meffre, M. C. Nussenzweig, Predominant autoantibody production by early human B cell precursors, *Science*. 301 (2003) 1374-1377.
- [17] D. Nemazee, K. Buerki, Clonal deletion of autoreactive B lymphocytes in bone marrow chimeras, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 86 (1989) 8039-8043.
- [18] C.C. Goodnow, J. Crosbie, S. Adelstein, T. B. Lavoie, S. J. Smith-Gill, R. A. Brink, H. Pritchard-Briscoe, J. S. Wotherspoon, R. H. Loblay, K. Raphael, Altered immunoglobulin expression and functional silencing of self-reactive B lymphocytes in transgenic mice, *Nature*. 334 (1988) 676-682.
- [19] D. Gay, T. Saunders, S. Camper, M. Weigert, Receptor editing: an approach by autoreactive B cells to escape tolerance, *J. Exp. Med.* 177 (1993) 999-1008.
- [20] L. Flaishon, S. Becker-Herman, G. Hart, Y. Levo, W. A. Kuziel, I. Shachar, Expression of the chemokine receptor CCR2 on immature B cells negatively regulates their cytoskeletal rearrangement and migration, *Blood*. 104 (2004) 933-941.
- [21] K.M. Ansel, V. N. Ngo, P. L. Hyman, S. A. Luther, R. Förster, J. D. Sedgwick, J. L. Browning, M. Lipp, J. G. Cyster, A chemokine-driven positive feedback loop organizes lymphoid follicles, *Nature*. 406 (2000) 309-314.
- [22] H. Wang, J. Feng, C. F. Qi, Z. Li, H. C. Morse, S. H. Clarke, Transitional B cells lose their ability to receptor edit but retain their potential for positive and negative selection, *J. Immunol.* 179 (2007) 7544-7552.
- [23] E.V. Acosta-Rodríguez, M. C. Merino, C. L. Montes, C. C. Motrán, A. Gruppi, Cytokines and chemokines shaping the B-cell compartment, *Cytokine. Growth. Factor. Rev.* 18 (2007) 73-83.
- [24] S. Casola, K. L. Otipoby, M. Alimzhanov, S. Humme, N. Uyttersprot, J. L. Kutok, M. C. Carroll, K. Rajewsky, B cell receptor signal strength determines B cell fate, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 317-327.
- [25] A. Cariappa, M. Tang, C. Parng, E. Nebelitskiy, M. Carroll, K. Georgopoulos, S. Pillai, The follicular versus marginal zone B lymphocyte cell fate decision is regulated by Aiolos, Btk, and CD21, *Immunity*. 14 (2001) 603-615.
- [26] K.P. Lam, K. Rajewsky, B cell antigen receptor specificity and surface density together determine B-1 versus B-2 cell development, *J. Exp. Med.* 190 (1999) 471-477.
- [27] F. Capolunghi, S. Cascioli, E. Giorda, M. M. Rosado, A. Plebani, C. Auriti, G. Seganti, R. Zuntini, S. Ferrari, M. Cagliuso, I. Quinti, R. Carsetti, CpG drives human transitional B cells to terminal differentiation and production of natural antibodies, *J. Immunol.* 180 (2008) 800-808.
- [28] T.G. Phan, E. E. Gray, J. G. Cyster, The microanatomy of B cell activation, *Curr. Opin. Immunol.* 21 (2009) 258-265.
- [29] K. Suzuki, I. Grigorova, T. G. Phan, L. M. Kelly, J. G. Cyster, Visualizing B cell capture of cognate antigen from follicular dendritic cells, *J. Exp. Med.* 206 (2009) 1485-1493.
- [30] S.R. Schwab, J. G. Cyster, Finding a way out: lymphocyte egress from lymphoid organs, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 1295-1301.
- [31] K. Reif, E. H. Ekland, L. Ohl, H. Nakano, M. Lipp, R. Förster, J. G. Cyster, Balanced responsiveness to chemoattractants from adjacent zones determines B-cell position, *Nature*. 416 (2002) 94-99.
- [32] R. Förster, A. Schubel, D. Breitfeld, E. Kremmer, I. Renner-Müller, E. Wolf, M. Lipp, CCR7 coordinates the primary immune response by establishing functional microenvironments in secondary lymphoid organs, *Cell*. 99 (1999) 23-33.

- [33] D. Tarlinton, A. Radbruch, F. Hiepe, T. Dörner, Plasma cell differentiation and survival, *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 162-169.
- [34] J. William, C. Euler, S. Christensen, M. J. Shlomchik, Evolution of autoantibody responses via somatic hypermutation outside of germinal centers, *Science.* 297 (2002) 2066-2070.
- [35] C.D. Allen, K. M. Ansel, C. Low, R. Lesley, H. Tamamura, N. Fujii, J. G. Cyster, Germinal center dark and light zone organization is mediated by CXCR4 and CXCR5, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 943-952.
- [36] Y. Takahashi, H. Ohta, T. Takemori, Fas is required for clonal selection in germinal centers and the subsequent establishment of the memory B cell repertoire, *Immunity.* 14 (2001) 181-192.
- [37] C.G. Vinuesa, S. G. Tangye, B. Moser, C. R. Mackay, Follicular B helper T cells in antibody responses and autoimmunity, *Nat. Rev. Immunol.* 5 (2005) 853-865.
- [38] C.A. Reynaud, S. Aoufouchi, A. Faili, J. C. Weill, What role for AID: mutator, or assembler of the immunoglobulin mutasome? *Nat. Immunol.* 4 (2003) 631-638.
- [39] C. Wei, J. Anolik, A. Cappione, B. Zheng, A. Pugh-Bernard, J. Brooks, E. H. Lee, E. C. Milner, I. Sanz, A new population of cells lacking expression of CD27 represents a notable component of the B cell memory compartment in systemic lupus erythematosus, *J. Immunol.* 178 (2007) 6624-6633.
- [40] S. Weller, A. Faili, C. Garcia, M. C. Braun, F. Le Deist F, G. de Saint Basile G, O. Hermine, A. Fischer, C. A. Reynaud, J. C. Weill, CD40-CD40L independent Ig gene hypermutation suggests a second B cell diversification pathway in humans, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 1166-1170.
- [41] C. Lee-Chang, D. Lefranc, J. Salleron, C. Faveeuw, C. Allet, P. Vermersch, B. Oxombre, L. Prin, Susceptibility to experimental autoimmune encephalomyelitis is associated with altered B-cell subsets distribution and decreased serum BAFF levels, *Immunol. Lett.* (2010).
- [42] E.J. Goetzl, H. Rosen, Regulation of immunity by lysosphingolipids and their G protein-coupled receptors, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 1531-1537.
- [43] T.T. Lu, J. G. Cyster, Integrin-mediated long-term B cell retention in the splenic marginal zone, *Science.* 297 (2002) 409-412.
- [44] G. Cinamon, M. Matloubian, M. J. Lesneski, Y. Xu, C. Low, T. Lu, R. L. Proia, J. G. Cyster, Sphingosine 1-phosphate receptor 1 promotes B cell localization in the splenic marginal zone, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 713-720.
- [45] I. Girkontaite, V. Sakk, M. Wagner, T. Borggrefe, K. Tedford, J. Chun, K. D. Fischer, The sphingosine-1-phosphate (S1P) lysophospholipid receptor S1P3 regulates MAdCAM-1+ endothelial cells in splenic marginal sinus organization, *J. Exp. Med.* 200 (2004) 1491-1501.
- [46] E.A. Koppel, M. Litjens, V. C. van den Berg, Y. van Kooyk, T. B. Geijtenbeek, Interaction of SIGNR1 expressed by marginal zone macrophages with marginal zone B cells is essential to early IgM responses against *Streptococcus pneumoniae*, *Mol. Immunol.* 45 (2008) 2881-2887.
- [47] Y.S. Kang, J. Y. Kim, S. A. Bruening, M. Pack, A. Charalambous, A. Pritsker, T. M. Moran, J. M. Loeffler, R. M. Steinman, C. G. Park, The C-type lectin SIGN-R1 mediates uptake of the capsular polysaccharide of *Streptococcus pneumoniae* in the marginal zone of mouse spleen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 215-220.
- [48] A.L. Leisewitz, K. A. Rockett, B. Gumede, M. Jones, B. Urban, D. P. Kwiatkowski, Response of the splenic dendritic cell population to malaria infection, *Infect. Immun.* 72 (2004) 4233-4239.

- [49] A. Zandvoort, W. Timens, The dual function of the splenic marginal zone: essential for initiation of anti-TI-2 responses but also vital in the general first-line defense against blood-borne antigens, *Clin. Exp. Immunol.* 130 (2002) 4-11.
- [50] A.M. Oliver, F. Martin, J. F. Kearney, IgM^{high}CD21^{high} lymphocytes enriched in the splenic marginal zone generate effector cells more rapidly than the bulk of follicular B cells, *J. Immunol.* 162 (1999) 7198-7207.
- [51] A.R. Ferguson, M. E. Youd, R. B. Corley, Marginal zone B cells transport and deposit IgM-containing immune complexes onto follicular dendritic cells, *Int. Immunol.* 16 (2004) 1411-1422.
- [52] K. Attanavanich, J. F. Kearney, Marginal zone, but not follicular B cells, are potent activators of naive CD4 T cells, *J. Immunol.* 172 (2004) 803-811.
- [53] K.H. Sonoda, J. Stein-Streilein, CD1d on antigen-transporting APC and splenic marginal zone B cells promotes NKT cell-dependent tolerance, *Eur. J. Immunol.* 32 (2002) 848-857.
- [54] S. Weller, M. C. Braun, B. K. Tan, A. Rosenwald, C. Cordier, M. E. Conley, A. Plebani, D. S. Kumararatne, D. Bonnet, O. Tournilhac, G. Tchernia, B. Steiniger, L. M. Staudt, J. L. Casanova, C. A. Reynaud, J. C. Weill, Human blood IgM "memory" B cells are circulating splenic marginal zone B cells harboring a prediversified immunoglobulin repertoire, *Blood.* 104 (2004) 3647-3654.
- [55] R. Ettinger, G. P. Sims, R. Robbins, D. Withers, R. T. Fischer, A. C. Grammer, S. Kuchen, P. E. Lipsky, IL-21 and BAFF/BLyS synergize in stimulating plasma cell differentiation from a unique population of human splenic memory B cells, *J. Immunol.* 178 (2007) 2872-2882.
- [56] U. Klein, K. Rajewsky, R. Küppers, Human immunoglobulin (Ig)M⁺IgD⁺ peripheral blood B cells expressing the CD27 cell surface antigen carry somatically mutated variable region genes: CD27 as a general marker for somatically mutated (memory) B cells, *J. Exp. Med.* 188 (1998) 1679-1689.
- [57] F. Martin, A. M. Oliver, J. F. Kearney, Marginal zone and B1 B cells unite in the early response against T-independent blood-borne particulate antigens, *Immunity.* 14 (2001) 617-629.
- [58] K.T. Merrell, R. J. Benschop, S. B. Gauld, K. Aviszus, D. Decote-Ricardo, L. J. Wsocki, J. C. Cambier, Identification of anergic B cells within a wild-type repertoire, *Immunity.* 25 (2006) 953-962.
- [59] D. Allman, R. C. Lindsley, W. DeMuth, K. Rudd, S. A. Shinton, R. R. Hardy, Resolution of three nonproliferative immature splenic B cell subsets reveals multiple selection points during peripheral B cell maturation, *J. Immunol.* 167 (2001) 6834-6840.
- [60] I. Isnardi, Y. S. Ng, L. Menard, G. Meyers, D. Saadoun, I. Srdanovic, J. Samuels, J. Berman, J. H. Buckner, C. Cunningham-Rundles, E. Meffre, Complement receptor 2/CD21- human naive B cells contain mostly autoreactive unresponsive clones, *Blood.* 115 (2010) 5026-5036.
- [61] K. Hayakawa, R. R. Hardy, D. R. Parks, L. A. Herzenberg, The "Ly-1 B" cell subpopulation in normal immunodeficient, and autoimmune mice, *J. Exp. Med.* 157 (1983) 202-218.
- [62] F. Caligaris-Cappio, M. Gobbi, M. Bofill, G. Janossy, Infrequent normal B lymphocytes express features of B-chronic lymphocytic leukemia, *J. Exp. Med.* 155 (1982) 623-628.
- [63] K. Hayakawa, R. R. Hardy, A. M. Stall, L. A. Herzenberg, Immunoglobulin-bearing B cells reconstitute and maintain the murine Ly-1 B cell lineage, *Eur. J. Immunol.* 16 (1986) 1313-1316.
- [64] K. Hayakawa, R. R. Hardy, L. A. Herzenberg, Progenitors for Ly-1 B cells are distinct from progenitors for other B cells, *J. Exp. Med.* 161 (1985) 1554-1568.

- [65] J.J. Peschon, P. J. Morrissey, K. H. Grabstein, F. J. Ramsdell, E. Maraskovsky, B. C. Gliniak, L. S. Park, S. F. Ziegler, D. E. Williams, C. B. Ware, J. D. Meyer, B. L. Davison, Early lymphocyte expansion is severely impaired in interleukin 7 receptor-deficient mice, *J. Exp. Med.* 180 (1994) 1955-1960.
- [66] U. von Freeden-Jeffry, P. Vieira, L. A. Lucian, T. McNeil, S. E. Burdach, R. Murray, Lymphopenia in interleukin (IL)-7 gene-deleted mice identifies IL-7 as a nonredundant cytokine, *J. Exp. Med.* 181 (1995) 1519-1526.
- [67] B.L. Esplin, R. S. Welner, Q. Zhang, L. A. Borghesi, P. W. Kincade, A differentiation pathway for B1 cells in adult bone marrow, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 5773-5778.
- [68] R.R. Hardy, B-1 B cell development, *J. Immunol.* 177 (2006) 2749-2754.
- [69] R.R. Hardy, B-1 B cells: development, selection, natural autoantibody and leukemia, *Curr. Opin. Immunol.* 18 (2006) 547-555.
- [70] N. Baumgarth, O. C. Herman, G. C. Jager, L. Brown, L. A. Herzenberg, L. A. Herzenberg, Innate and acquired humoral immunities to influenza virus are mediated by distinct arms of the immune system, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 96 (1999) 2250-2255.
- [71] Y. Yang, J. W. Tung, E. E. Ghosn, L. A. Herzenberg, L. A. Herzenberg, Division and differentiation of natural antibody-producing cells in mouse spleen, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 104 (2007) 4542-4546.
- [72] K.M. Haas, J. C. Poe, D. A. Steeber, T. F. Tedder, B-1a and B-1b cells exhibit distinct developmental requirements and have unique functional roles in innate and adaptive immunity to *S. pneumoniae*, *Immunity.* 23 (2005) 7-18.
- [73] B. Roy, S. Shukla, M. Łyszkiewicz, M. Krey, N. Viegas, S. Düber, S. Weiss, Somatic hypermutation in peritoneal B1b cells, *Mol. Immunol.* 46 (2009) 1613-1619.
- [74] S. Jacquot, O. Boyer, [Heterogeneity and function of human B lymphocytes], *Med. Sci. (Paris).* 22 (2006) 1075-1080.
- [75] P. Scapini, A. Carletto, B. Nardelli, F. Calzetti, V. Roschke, F. Merigo, N. Tamassia, S. Pieropan, D. Biasi, A. Sbarbati, S. Sozzani, L. Bambara, M. A. Cassatella, Proinflammatory mediators elicit secretion of the intracellular B-lymphocyte stimulator pool (BLyS) that is stored in activated neutrophils: implications for inflammatory diseases, *Blood.* 105 (2005) 830-837.
- [76] A. Craxton, D. Magaletti, E. J. Ryan, E. A. Clark, Macrophage- and dendritic cell--dependent regulation of human B-cell proliferation requires the TNF family ligand BAFF, *Blood.* 101 (2003) 4464-4471.
- [77] P. Scapini, B. Nardelli, G. Nadali, F. Calzetti, G. Pizzolo, C. Montecucco, M. A. Cassatella, G-CSF-stimulated neutrophils are a prominent source of functional BLyS, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 297-302.
- [78] B. Nardelli, O. Belvedere, V. Roschke, P. A. Moore, H. S. Olsen, T. S. Migone, S. Sosnovtseva, J. A. Carrell, P. Feng, J. G. Giri, others, Synthesis and release of B-lymphocyte stimulator from myeloid cells, *Blood.* 97 (2001) 198.
- [79] G. Hardenberg, L. Planelles, C. M. Schwarte, L. van Bostelen, T. Le Huong, M. Hahne, J. P. Medema, Specific TLR ligands regulate APRIL secretion by dendritic cells in a PKR-dependent manner, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 2900-2911.
- [80] M.W. Boulé, C. Broughton, F. Mackay, S. Akira, A. Marshak-Rothstein, I. R. Rifkin, Toll-like receptor 9-dependent and -independent dendritic cell activation by chromatin-immunoglobulin G complexes, *J. Exp. Med.* 199 (2004) 1631-1640.

- [81] F. Lavie, C. Miceli-Richard, M. Ittah, J. Sellam, J. E. Gottenberg, X. Mariette, B-cell activating factor of the tumour necrosis factor family expression in blood monocytes and T cells from patients with primary Sjögren's syndrome, *Scand. J. Immunol.* 67 (2008) 185-192.
- [82] V.T. Chu, P. Enghard, G. Riemekasten, C. Berek, In vitro and in vivo activation induces BAFF and APRIL expression in B cells, *J. Immunol.* 179 (2007) 5947-5957.
- [83] B. Huard, T. McKee, C. Bosshard, S. Durual, T. Matthes, S. Myit, O. Donze, C. Frossard, C. Chizzolini, C. Favre, R. Zubler, J. P. Guyot, P. Schneider, E. Roosnek, APRIL secreted by neutrophils binds to heparan sulfate proteoglycans to create plasma cell niches in human mucosa, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 2887-2895.
- [84] P. Rennert, P. Schneider, T. G. Cachero, J. Thompson, L. Trabach, S. Hertig, N. Holler, F. Qian, C. Mullen, K. Strauch, J. L. Browning, C. Ambrose, J. Tschopp, A soluble form of B cell maturation antigen, a receptor for the tumor necrosis factor family member APRIL, inhibits tumor cell growth, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1677-1684.
- [85] M. Yan, J. R. Brady, B. Chan, W. P. Lee, B. Hsu, S. Harless, M. Cancro, I. S. Grewal, V. M. Dixit, Identification of a novel receptor for B lymphocyte stimulator that is mutated in a mouse strain with severe B cell deficiency, *Curr. Biol.* 11 (2001) 1547-1552.
- [86] M. Pelletier, J. S. Thompson, F. Qian, S. A. Bixler, D. Gong, T. Cachero, K. Gilbride, E. Day, M. Zafari, C. Benjamin, L. Gorelik, A. Whitty, S. L. Kalled, C. Ambrose, Y. M. Hsu, Comparison of soluble decoy IgG fusion proteins of BAFF-R and BCMA as antagonists for BAFF, *J. Biol. Chem.* 278 (2003) 33127-33133.
- [87] K.L. Hoek, G. Carlesso, E. S. Clark, W. N. Khan, Absence of mature peripheral B cell populations in mice with concomitant defects in B cell receptor and BAFF-R signaling, *J. Immunol.* 183 (2009) 5630-5643.
- [88] S. Shulga-Morskaya, M. Dobles, M. E. Walsh, L. G. Ng, F. MacKay, S. P. Rao, S. L. Kalled, M. L. Scott, B cell-activating factor belonging to the TNF family acts through separate receptors to support B cell survival and T cell-independent antibody formation, *J. Immunol.* 173 (2004) 2331-2341.
- [89] L. Gorelik, K. Gilbride, M. Dobles, S. L. Kalled, D. Zandman, M. L. Scott, Normal B cell homeostasis requires B cell activation factor production by radiation-resistant cells, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 937-945.
- [90] Z.S. Rahman, S. P. Rao, S. L. Kalled, T. Manser, Normal induction but attenuated progression of germinal center responses in BAFF and BAFF-R signaling-deficient mice, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 1157-1169.
- [91] K.A. Vora, L. C. Wang, S. P. Rao, Z. Y. Liu, G. R. Majeau, A. H. Cutler, P. S. Hochman, M. L. Scott, S. L. Kalled, Cutting edge: germinal centers formed in the absence of B cell-activating factor belonging to the TNF family exhibit impaired maturation and function, *J. Immunol.* 171 (2003) 547-551.
- [92] L. Gorelik, A. H. Cutler, G. Thill, S. D. Miklasz, D. E. Shea, C. Ambrose, S. A. Bixler, L. Su, M. L. Scott, S. L. Kalled, Cutting edge: BAFF regulates CD21/35 and CD23 expression independent of its B cell survival function, *J. Immunol.* 172 (2004) 762-766.
- [93] M. Balázs, F. Martin, T. Zhou, J. Kearney, Blood dendritic cells interact with splenic marginal zone B cells to initiate T-independent immune responses, *Immunity.* 17 (2002) 341-352.
- [94] B. He, R. Santamaria, W. Xu, M. Cols, K. Chen, I. Puga, M. Shan, H. Xiong, J. B. Bussel, A. Chiu, A. Puel, J. Reichenbach, L. Marodi, R. Döffinger, J. Vasconcelos, A. Issekutz, J. Krause, G. Davies, X. Li, B. Grimbacher, A. Plebani, E. Meffre, C. Picard, C. Cunningham-Rundles, J. L. Casanova, A. Cerutti, The transmembrane activator TACI triggers immunoglobulin class switching by activating B cells through the adaptor MyD88, *Nat. Immunol.* (2010).

- [95] E. Belnoue, M. Pihlgren, T. L. McGaha, C. Tougne, A. F. Rochat, C. Bossen, P. Schneider, B. Huard, P. H. Lambert, C. A. Siegrist, APRIL is critical for plasmablast survival in the bone marrow and poorly expressed by early-life bone marrow stromal cells, *Blood*. 111 (2008) 2755-2764.
- [96] C. Bossen, T. G. Cachero, A. Tardivel, K. Ingold, L. Willen, M. Dobles, M. L. Scott, A. Maquelin, E. Belnoue, C. A. Siegrist, S. Chevrier, H. Acha-Orbea, H. Leung, F. Mackay, J. Tschopp, P. Schneider, TACI, unlike BAFF-R, is solely activated by oligomeric BAFF and APRIL to support survival of activated B cells and plasmablasts, *Blood*. 111 (2008) 1004-1012.
- [97] G.T. Mantchev, C. S. Cortesão, M. Rebrovich, M. Cascalho, R. J. Bram, TACI is required for efficient plasma cell differentiation in response to T-independent type 2 antigens, *J. Immunol*. 179 (2007) 2282-2288.
- [98] J.R. Groom, C. A. Fletcher, S. N. Walters, S. T. Grey, S. V. Watt, M. J. Sweet, M. J. Smyth, C. R. Mackay, F. Mackay, BAFF and MyD88 signals promote a lupuslike disease independent of T cells, *J. Exp. Med*. 204 (2007) 1959-1971.
- [99] D. Seshasayee, P. Valdez, M. Yan, V. M. Dixit, D. Tumas, I. S. Grewal, Loss of TACI causes fatal lymphoproliferation and autoimmunity, establishing TACI as an inhibitory BlyS receptor, *Immunity*. 18 (2003) 279-288.
- [100] M. Yan, H. Wang, B. Chan, M. Roose-Girma, S. Erickson, T. Baker, D. Tumas, I. S. Grewal, V. M. Dixit, Activation and accumulation of B cells in TACI-deficient mice, *Nat. Immunol*. 2 (2001) 638-643.
- [101] B.P. O'Connor, V. S. Raman, L. D. Erickson, W. J. Cook, L. K. Weaver, C. Ahonen, L. L. Lin, G. T. Mantchev, R. J. Bram, R. J. Noelle, BCMA is essential for the survival of long-lived bone marrow plasma cells, *J. Exp. Med*. 199 (2004) 91-98.
- [102] M. Yang, H. Hase, D. Legarda-Addison, L. Varughese, B. Seed, A. T. Ting, B cell maturation antigen, the receptor for a proliferation-inducing ligand and B cell-activating factor of the TNF family, induces antigen presentation in B cells, *J. Immunol*. 175 (2005) 2814-2824.
- [103] M.J. Benson, S. R. Dillon, E. Castigli, R. S. Geha, S. Xu, K. P. Lam, R. J. Noelle, Cutting edge: the dependence of plasma cells and independence of memory B cells on BAFF and APRIL, *J. Immunol*. 180 (2008) 3655-3659.
- [104] P. Schneider, The role of APRIL and BAFF in lymphocyte activation, *Curr. Opin. Immunol*. 17 (2005) 282-289.
- [105] F. Mackay, P. Schneider, Cracking the BAFF code, *Nat. Rev. Immunol*. 9 (2009) 491-502.
- [106] B. Lemaitre, E. Nicolas, L. Michaut, J. M. Reichhart, J. A. Hoffmann, The dorsoventral regulatory gene cassette *spätzle/Toll/cactus* controls the potent antifungal response in *Drosophila* adults, *Cell*. 86 (1996) 973-983.
- [107] E. Bourke, D. Bosisio, J. Golay, N. Polentarutti, A. Mantovani, The toll-like receptor repertoire of human B lymphocytes: inducible and selective expression of TLR9 and TLR10 in normal and transformed cells, *Blood*. 102 (2003) 956-963.
- [108] A. Dolganiuc, C. Garcia, K. Kodys, G. Szabo, Distinct Toll-like receptor expression in monocytes and T cells in chronic HCV infection, *World. J. Gastroenterol*. 12 (2006) 1198-1204.
- [109] I. Sabroe, L. R. Prince, E. C. Jones, M. J. Horsburgh, S. J. Foster, S. N. Vogel, S. K. Dower, M. K. Whyte, Selective roles for Toll-like receptor (TLR)2 and TLR4 in the regulation of neutrophil activation and life span, *J. Immunol*. 170 (2003) 5268-5275.

- [110] S. Sivori, M. Falco, M. Della Chiesa, S. Carlomagno, M. Vitale, L. Moretta, A. Moretta, CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 10116-10121.
- [111] M. Kulka, L. Alexopoulou, R. A. Flavell, D. D. Metcalfe, Activation of mast cells by double-stranded RNA: evidence for activation through Toll-like receptor 3, *J. Allergy. Clin. Immunol.* 114 (2004) 174-182.
- [112] J.M. Davies, J. Macsharry, F. Shanahan, Differential regulation of Toll-like receptor signalling in spleen and Peyer's patch dendritic cells, *Immunology.* (2010).
- [113] A. Visintin, A. Mazzoni, J. H. Spitzer, D. H. Wyllie, S. K. Dower, D. M. Segal, Regulation of Toll-like receptors in human monocytes and dendritic cells, *J. Immunol.* 166 (2001) 249-255.
- [114] H. Kinoshita, T. Takai, T. A. Le, S. Kamijo, X. L. Wang, H. Ushio, M. Hara, J. Kawasaki, A. T. Vu, T. Ogawa, H. Gunawan, S. Ikeda, K. Okumura, H. Ogawa, Cytokine milieu modulates release of thymic stromal lymphopoietin from human keratinocytes stimulated with double-stranded RNA, *J. Allergy. Clin. Immunol.* 123 (2009) 179-186.
- [115] M.N. Manoussakis, M. P. Spachidou, C. I. Maratheftis, Salivary epithelial cells from Sjogren's syndrome patients are highly sensitive to anoikis induced by TLR-3 ligation, *J. Autoimmun.* (2010).
- [116] G.A. Farina, M. R. York, M. Di Marzio, C. A. Collins, S. Meller, B. Homey, I. R. Rifkin, A. Marshak-Rothstein, T. R. Radstake, R. Lafyatis, Poly(I:C) Drives Type I IFN- and TGFbeta-Mediated Inflammation and Dermal Fibrosis Simulating Altered Gene Expression in Systemic Sclerosis, *J. Invest. Dermatol.* (2010).
- [117] G.M. Barton, J. C. Kagan, A cell biological view of Toll-like receptor function: regulation through compartmentalization, *Nat. Rev. Immunol.* 9 (2009) 535-542.
- [118] T. Kawai, S. Akira, Toll-like receptor and RIG-I-like receptor signaling, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1143 (2008) 1-20.
- [119] T. Kawai, S. Akira, TLR signaling, *Cell. Death. Differ.* 13 (2006) 816-825.
- [120] K.A. Fitzgerald, D. C. Rowe, B. J. Barnes, D. R. Caffrey, A. Visintin, E. Latz, B. Monks, P. M. Pitha, D. T. Golenbock, LPS-TLR4 signaling to IRF-3/7 and NF-kappaB involves the toll adapters TRAM and TRIF, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 1043-1055.
- [121] M.K. Newell, R. P. Tobin, J. H. Cabrera, M. B. Sorensen, A. Huckstep, E. M. Villalobos-Menuey, M. Burnett, E. McCrea, C. P. Harvey, A. Buddiga, A. Bar-Or, M. S. Freedman, J. Nalbantoglu, N. Arbour, S. S. Zamvil, J. P. Antel, TLR-mediated B cell activation results in ectopic CLIP expression that promotes B cell-dependent inflammation, *J. Leukoc. Biol.* (2010).
- [122] T.J. Vanden Bush, G. A. Bishop, TLR7 and CD40 cooperate in IL-6 production via enhanced JNK and AP-1 activation, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 400-409.
- [123] W. Jiang, M. M. Lederman, C. V. Harding, B. Rodriguez, R. J. Mohner, S. F. Sieg, TLR9 stimulation drives naïve B cells to proliferate and to attain enhanced antigen presenting function, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 2205-2213.
- [124] C.R. Ruprecht, A. Lanzavecchia, Toll-like receptor stimulation as a third signal required for activation of human naïve B cells, *Eur. J. Immunol.* 36 (2006) 810-816.
- [125] K.L. Good, D. T. Avery, S. G. Tangye, Resting human memory B cells are intrinsically programmed for enhanced survival and responsiveness to diverse stimuli compared to naïve B cells, *J. Immunol.* 182 (2009) 890-901.

- [126] N.L. Bernasconi, N. Onai, A. Lanzavecchia, A role for Toll-like receptors in acquired immunity: up-regulation of TLR9 by BCR triggering in naive B cells and constitutive expression in memory B cells, *Blood*. 101 (2003) 4500-4504.
- [127] S. Iskra, M. Kalla, H. J. Delecluse, W. Hammerschmidt, A. Moosmann, Toll-like receptor agonists synergistically increase proliferation and activation of B cells by epstein-barr virus, *J. Virol.* 84 (2010) 3612-3623.
- [128] L. Cervantes-Barragán, C. Gil-Cruz, R. Pastelin-Palacios, K. S. Lang, A. Isibasi, B. Ludewig, C. López-Macías, TLR2 and TLR4 signaling shapes specific antibody responses to *Salmonella typhi* antigens, *Eur. J. Immunol.* 39 (2009) 126-135.
- [129] A. Jegerlehner, P. Maurer, J. Bessa, H. J. Hinton, M. Kopf, M. F. Bachmann, TLR9 signaling in B cells determines class switch recombination to IgG2a, *J. Immunol.* 178 (2007) 2415-2420.
- [130] M. Gururajan, J. Jacob, B. Pulendran, Toll-like receptor expression and responsiveness of distinct murine splenic and mucosal B-cell subsets, *Plos. One.* 2 (2007) e863.
- [131] L. Genestier, M. Taillardet, P. Mondiere, H. Gheit, C. Bella, T. Defrance, TLR agonists selectively promote terminal plasma cell differentiation of B cell subsets specialized in thymus-independent responses, *J. Immunol.* 178 (2007) 7779-7786.
- [132] A.V. Rubtsov, C. L. Swanson, S. Troy, P. Strauch, R. Peland, R. M. Torres, TLR agonists promote marginal zone B cell activation and facilitate T-dependent IgM responses, *J. Immunol.* 180 (2008) 3882-3888.
- [133] R. Diz, S. K. McCray, S. H. Clarke, B cell receptor affinity and B cell subset identity integrate to define the effectiveness, affinity threshold, and mechanism of anergy, *J. Immunol.* 181 (2008) 3834-3840.
- [134] C. Arpin, J. Banchereau, Y. J. Liu, Memory B cells are biased towards terminal differentiation: a strategy that may prevent repertoire freezing, *J. Exp. Med.* 186 (1997) 931-940.
- [135] J.H. Han, S. Akira, K. Calame, B. Beutler, E. Selsing, T. Imanishi-Kari, Class switch recombination and somatic hypermutation in early mouse B cells are mediated by B cell and Toll-like receptors, *Immunity.* 27 (2007) 64-75.
- [136] B. He, X. Qiao, A. Cerutti, CpG DNA induces IgG class switch DNA recombination by activating human B cells through an innate pathway that requires TLR9 and cooperates with IL-10, *J. Immunol.* 173 (2004) 4479-4491.
- [137] Y. Ueda, D. Liao, K. Yang, A. Patel, G. Kelsoe, T-independent activation-induced cytidine deaminase expression, class-switch recombination, and antibody production by immature/transitional 1 B cells, *J. Immunol.* 178 (2007) 3593-3601.
- [138] D. Chiron, I. Bekeredjian-Ding, C. Pellat-Deceunynck, R. Bataille, G. Jego, Toll-like receptors: lessons to learn from normal and malignant human B cells, *Blood.* 112 (2008) 2205-2213.
- [139] H. Wolburg, A. Lippoldt, Tight junctions of the blood-brain barrier: development, composition and regulation, *Vascul. Pharmacol.* 38 (2002) 323-337.
- [140] N. Weiss, F. Miller, S. Cazaubon, P. O. Couraud, [Biology of the blood-brain barrier: Part I], *Rev. Neurol. (Paris).* 165 (2009) 863-874.
- [141] L.L. Rubin, J. M. Staddon, The cell biology of the blood-brain barrier, *Annual. Review. Of. Neuroscience.* 22 (1999) 11-28.

- [142] I.I. Arciénega, J. F. Brunet, J. Bloch, J. Badaut, Cell locations for AQP1, AQP4 and 9 in the non-human primate brain, *Neuroscience*. 167 (2010) 1103-1114.
- [143] S. Nielsen, B. L. Smith, E. I. Christensen, P. Agre, Distribution of the aquaporin CHIP in secretory and resorptive epithelia and capillary endothelia, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 7275-7279.
- [144] L.S. King, P. Agre, Pathophysiology of the aquaporin water channels, *Annu. Rev. Physiol.* 58 (1996) 619-648.
- [145] W. Löscher, H. Potschka, Drug resistance in brain diseases and the role of drug efflux transporters, *Nat. Rev. Neurosci.* 6 (2005) 591-602.
- [146] E.C. de Lange, Potential role of ABC transporters as a detoxification system at the blood-CSF barrier, *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 56 (2004) 1793-1809.
- [147] F. Miller, L. Fenart, V. Landry, C. Coisne, R. Cecchelli, M. P. Dehouck, V. Buée-Scherrer, The MAP kinase pathway mediates transcytosis induced by TNF-alpha in an in vitro blood-brain barrier model, *Eur. J. Neurosci.* 22 (2005) 835-844.
- [148] Y. Zhang, W. M. Pardridge, Rapid transferrin efflux from brain to blood across the blood-brain barrier, *J. Neurochem.* 76 (2001) 1597-1600.
- [149] W.M. Pardridge, R. J. Boado, Y. S. Kang, Vector-mediated delivery of a polyamide ("peptide") nucleic acid analogue through the blood-brain barrier in vivo, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 92 (1995) 5592-5596.
- [150] K.R. Duffy, W. M. Pardridge, Blood-brain barrier transcytosis of insulin in developing rabbits, *Brain. Res.* 420 (1987) 32-38.
- [151] B. Engelhardt, L. Sorokin, The blood-brain and the blood-cerebrospinal fluid barriers: function and dysfunction, *Semin. Immunopathol.* 31 (2009) 497-511.
- [152] H. Wolburg, K. Wolburg-Buchholz, S. Liebner, B. Engelhardt, Claudin-1, claudin-2 and claudin-11 are present in tight junctions of choroid plexus epithelium of the mouse, *Neurosci. Lett.* 307 (2001) 77-80.
- [153] P.L. Longatti, L. Basaldella, E. Orvieto, A. Fiorindi, A. Carteri, Choroid plexus and aquaporin-1: a novel explanation of cerebrospinal fluid production, *Pediatr. Neurosurg.* 40 (2004) 277-283.
- [154] T. Speake, L. J. Freeman, P. D. Brown, Expression of aquaporin 1 and aquaporin 4 water channels in rat choroid plexus, *Biochim. Biophys. Acta.* 1609 (2003) 80-86.
- [155] M. van Zwam, R. Huizinga, M. J. Melief, A. F. Wierenga-Wolf, M. van Meurs, J. S. Voerman, K. P. Biber, H. W. Boddeke, U. E. Höpken, C. Meisel, A. Meisel, I. Bechmann, R. Q. Hintzen, B. A. 't Hart, S. Amor, J. D. Laman, L. A. Boven, Brain antigens in functionally distinct antigen-presenting cell populations in cervical lymph nodes in MS and EAE, *J. Mol. Med.* 87 (2009) 273-286.
- [156] E. Hatterer, M. Touret, M. F. Belin, J. Honnorat, S. Nataf, Cerebrospinal fluid dendritic cells infiltrate the brain parenchyma and target the cervical lymph nodes under neuroinflammatory conditions, *Plos. One.* 3 (2008) e3321.
- [157] R.M. Ransohoff, P. Kivisäkk, G. Kidd, Three or more routes for leukocyte migration into the central nervous system, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 569-581.
- [158] S. Ribes, S. Ebert, T. Regen, A. Agarwal, S. C. Tauber, D. Czesnik, A. Spreer, S. Bunkowski, H. Eiffert, U. K. Hanisch, S. Hammerschmidt, R. Nau, Toll-like receptor stimulation enhances phagocytosis and intracellular killing of nonencapsulated and encapsulated *Streptococcus pneumoniae* by murine microglia, *Infect. Immun.* 78 (2010) 865-871.

- [159] S. Goethals, E. Ydens, V. Timmerman, S. Janssens, Toll-like receptor expression in the peripheral nerve, *Glia*. (2010).
- [160] C.S. McKimmie, J. K. Fazakerley, In response to pathogens, glial cells dynamically and differentially regulate Toll-like receptor gene expression, *J. Neuroimmunol.* 169 (2005) 116-125.
- [161] C.S. Jack, N. Arbour, J. Manusow, V. Montgrain, M. Blain, E. McCrea, A. Shapiro, J. P. Antel, TLR signaling tailors innate immune responses in human microglia and astrocytes, *J. Immunol.* 175 (2005) 4320-4330.
- [162] J.K. Olson, S. D. Miller, Microglia initiate central nervous system innate and adaptive immune responses through multiple TLRs, *J. Immunol.* 173 (2004) 3916-3924.
- [163] F. González-Scarano, G. Baltuch, Microglia as mediators of inflammatory and degenerative diseases, *Annu. Rev. Neurosci.* 22 (1999) 219-240.
- [164] W. Li, G. Gao, Q. Guo, D. Jia, J. Wang, X. Wang, S. He, Q. Liang, Function and phenotype of microglia are determined by toll-like receptor 2/toll-like receptor 4 activation sequence, *DNA. Cell. Biol.* 28 (2009) 493-499.
- [165] M.B. Graeber, W. J. Streit, D. Büringer, D. L. Sparks, G. W. Kreutzberg, Ultrastructural location of major histocompatibility complex (MHC) class II positive perivascular cells in histologically normal human brain, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 51 (1992) 303-311.
- [166] L. Vallières, P. E. Sawchenko, Bone marrow-derived cells that populate the adult mouse brain preserve their hematopoietic identity, *J. Neurosci.* 23 (2003) 5197-5207.
- [167] I. Bechmann, E. Kwidzinski, A. D. Kovac, E. Simbürger, T. Horvath, U. Gimsa, U. Dirnagl, J. Priller, R. Nitsch, Turnover of rat brain perivascular cells, *Exp. Neurol.* 168 (2001) 242-249.
- [168] P.G. McMenamin, R. J. Wealhall, M. Deverall, S. J. Cooper, B. Griffin, Macrophages and dendritic cells in the rat meninges and choroid plexus: three-dimensional localisation by environmental scanning electron microscopy and confocal microscopy, *Cell. Tissue. Res.* 313 (2003) 259-269.
- [169] C.J. Harling-Berg, T. J. Park, P. M. Knopf, Role of the cervical lymphatics in the Th2-type hierarchy of CNS immune regulation, *J. Neuroimmunol.* 101 (1999) 111-127.
- [170] I. Bechmann, J. Priller, A. Kovac, M. Böntert, T. Wehner, F. F. Klett, J. Bohsung, M. Stuschke, U. Dirnagl, R. Nitsch, Immune surveillance of mouse brain perivascular spaces by blood-borne macrophages, *Eur. J. Neurosci.* 14 (2001) 1651-1658.
- [171] M.T. de Graaf, P. A. Smitt, R. L. Luitwieler, C. van Velzen, P. D. van den Broek, J. Kraan, J. W. Gratama, Central memory CD4(+) T cells dominate the normal cerebrospinal fluid, *Cytometry. B. Clin. Cytom.* (2010).
- [172] M.D. Carrithers, I. Visintin, C. Viret, C. S. Janeway, Role of genetic background in P selectin-dependent immune surveillance of the central nervous system, *J. Neuroimmunol.* 129 (2002) 51-57.
- [173] J.V. Stein, G. Cheng, B. M. Stockton, B. P. Fors, E. C. Butcher, U. H. von Andrian, L-selectin-mediated leukocyte adhesion in vivo: microvillous distribution determines tethering efficiency, but not rolling velocity, *J. Exp. Med.* 189 (1999) 37-50.
- [174] U.H. von Andrian, S. R. Hasslen, R. D. Nelson, S. L. Erlandsen, E. C. Butcher, A central role for microvillous receptor presentation in leukocyte adhesion under flow, *Cell.* 82 (1995) 989-999.
- [175] C. Alt, M. Laschinger, B. Engelhardt, Functional expression of the lymphoid chemokines CCL19 (ELC) and CCL 21 (SLC) at the blood-brain barrier suggests their involvement in G-protein-dependent lymphocyte

- recruitment into the central nervous system during experimental autoimmune encephalomyelitis, *Eur. J. Immunol.* 32 (2002) 2133-2144.
- [176] P. Friedl, B. Weigelin, Interstitial leukocyte migration and immune function, *Nat. Immunol.* 9 (2008) 960-969.
- [177] C. Berlin, R. F. Bargatze, J. J. Campbell, U. H. von Andrian, M. C. Szabo, S. R. Hasslen, R. D. Nelson, E. L. Berg, S. L. Erlandsen, E. C. Butcher, alpha 4 integrins mediate lymphocyte attachment and rolling under physiologic flow, *Cell.* 80 (1995) 413-422.
- [178] B.J. Steffen, E. C. Butcher, B. Engelhardt, Evidence for involvement of ICAM-1 and VCAM-1 in lymphocyte interaction with endothelium in experimental autoimmune encephalomyelitis in the central nervous system in the SJL/J mouse, *Am. J. Pathol.* 145 (1994) 189-201.
- [179] J.L. Baron, J. A. Madri, N. H. Ruddle, G. Hashim, C. A. Janeway, Surface expression of alpha 4 integrin by CD4 T cells is required for their entry into brain parenchyma, *J. Exp. Med.* 177 (1993) 57-68.
- [180] A. Bar-Or, R. K. Nuttall, M. Duddy, A. Alter, H. J. Kim, I. Ifergan, C. J. Pennington, P. Bourgoin, D. R. Edwards, V. W. Yong, Analyses of all matrix metalloproteinase members in leukocytes emphasize monocytes as major inflammatory mediators in multiple sclerosis, *Brain.* 126 (2003) 2738-2749.
- [181] V. Brundula, N. B. Rewcastle, L. M. Metz, C. C. Bernard, V. W. Yong, Targeting leukocyte MMPs and transmigration: minocycline as a potential therapy for multiple sclerosis, *Brain.* 125 (2002) 1297-1308.
- [182] F. Aloisi, Immune function of microglia, *Glia.* 36 (2001) 165-179.
- [183] A. Reboldi, C. Coisne, D. Baumjohann, F. Benvenuto, D. Bottinelli, S. Lira, A. Uccelli, A. Lanzavecchia, B. Engelhardt, F. Sallusto, 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 (2009) 514-523.
- [184] F. Sellebjerg, L. Börnsen, M. Khademi, M. Krakauer, T. Olsson, J. L. Frederiksen, P. S. Sørensen, Increased cerebrospinal fluid concentrations of the chemokine CXCL13 in active MS, *Neurology.* 73 (2009) 2003-2010.
- [185] M. Krumbholz, D. Theil, F. Steinmeyer, S. Cepok, B. Hemmer, M. Hofbauer, C. Farina, T. Derfuss, A. Junker, T. Arzberger, I. Sinicina, C. Hartle, J. Newcombe, R. Hohlfeld, E. Meinl, CCL19 is constitutively expressed in the CNS, up-regulated in neuroinflammation, active and also inactive multiple sclerosis lesions, *J. Neuroimmunol.* 190 (2007) 72-79.
- [186] P. Kivisäkk, B. Tucky, T. Wei, J. J. Campbell, R. M. Ransohoff, Human cerebrospinal fluid contains CD4+ memory T cells expressing gut- or skin-specific trafficking determinants: relevance for immunotherapy, *BMC. Immunol.* 7 (2006) 14.
- [187] P. Kivisäkk, D. J. Mahad, M. K. Callahan, C. Trebst, B. Tucky, T. Wei, L. Wu, E. S. Baekkevold, H. Lassmann, S. M. Staugaitis, J. J. Campbell, R. M. Ransohoff, Human cerebrospinal fluid central memory CD4+ T cells: evidence for trafficking through choroid plexus and meninges via P-selectin, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 100 (2003) 8389-8394.
- [188] E. Pedemonte, G. Mancardi, D. Giunti, A. Corcione, F. Benvenuto, V. Pistoia, A. Uccelli, Mechanisms of the adaptive immune response inside the central nervous system during inflammatory and autoimmune diseases, *Pharmacol. Ther.* 111 (2006) 555-566.

- [189] P.M. Knopf, C. J. Harling-Berg, H. F. Cserr, D. Basu, E. J. Sirulnick, S. C. Nolan, J. T. Park, G. Keir, E. J. Thompson, W. F. Hickey, Antigen-dependent intrathecal antibody synthesis in the normal rat brain: tissue entry and local retention of antigen-specific B cells, *J. Immunol.* 161 (1998) 692-701.
- [190] A.J. Bieber, A. Warrington, L. R. Pease, M. Rodriguez, Humoral autoimmunity as a mediator of CNS repair, *Trends. Neurosci.* 24 (2001) S39-S44.
- [191] E.O. Major, Progressive multifocal leukoencephalopathy in patients on immunomodulatory therapies, *Annu. Rev. Med.* 61 (2010) 35-47.
- [192] A. Fromont, C. Binquet, E. A. Sauleau, I. Fournel, A. Bellisario, J. Adnet, A. Weill, S. Vukusic, C. Confavreux, M. Debouverie, L. Clerc, C. Bonithon-Kopp, T. Moreau, Geographic variations of multiple sclerosis in France, *Brain.* 133 (2010) 1889-1899.
- [193] A.D. Sadovnick, G. C. Ebers, Epidemiology of multiple sclerosis: a critical overview, *Can. J. Neurol. Sci.* 20 (1993) 17-29.
- [194] B.G. Weinshenker, B. Bass, G. P. Rice, J. Noseworthy, W. Carriere, J. Baskerville, G. C. Ebers, The natural history of multiple sclerosis: a geographically based study. 2. Predictive value of the early clinical course, *Brain.* 112 (Pt 6) (1989) 1419-1428.
- [195] F.D. Lublin, S. C. Reingold, Defining the clinical course of multiple sclerosis: results of an international survey. National Multiple Sclerosis Society (USA) Advisory Committee on Clinical Trials of New Agents in Multiple Sclerosis, *Neurology.* 46 (1996) 907-911.
- [196] J.M. Frischer, S. Bramow, A. Dal-Bianco, C. F. Lucchinetti, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P. S. Sorensen, H. Lassmann, The relation between inflammation and neurodegeneration in multiple sclerosis brains, *Brain.* 132 (2009) 1175-1189.
- UNKNOWN PUBLICATION TYPE
- [198] A.P. Henderson, M. H. Barnett, J. D. Parratt, J. W. Prineas, Multiple sclerosis: distribution of inflammatory cells in newly forming lesions, *Ann. Neurol.* 66 (2009) 739-753.
- [199] C. Lucchinetti, W. Brück, J. Parisi, B. Scheithauer, M. Rodriguez, H. Lassmann, Heterogeneity of multiple sclerosis lesions: implications for the pathogenesis of demyelination, *Ann. Neurol.* 47 (2000) 707-717.
- [200] G.V. McDonnell, H. Mawhinney, C. A. Graham, S. A. Hawkins, D. Middleton, A study of the HLA-DR region in clinical subgroups of multiple sclerosis and its influence on prognosis, *J. Neurol. Sci.* 165 (1999) 77-83.
- [201] L.F. Barcellos, S. Sawcer, P. P. Ramsay, S. E. Baranzini, G. Thomson, F. Briggs, B. C. Cree, A. B. Begovich, P. Villoslada, X. Montalban, A. Uccelli, G. Savettieri, R. R. Lincoln, C. DeLoa, J. L. Haines, M. A. Pericak-Vance, A. Compston, S. L. Hauser, J. R. Oksenberg, Heterogeneity at the HLA-DRB1 locus and risk for multiple sclerosis, *Hum. Mol. Genet.* 15 (2006) 2813-2824.
- [202] L.F. Barcellos, J. R. Oksenberg, A. B. Begovich, E. R. Martin, S. Schmidt, E. Vittinghoff, D. S. Goodin, D. Pelletier, R. R. Lincoln, P. Bucher, A. Swerdlin, M. A. Pericak-Vance, J. L. Haines, S. L. Hauser, Multiple Sclerosis Genetics Group, HLA-DR2 dose effect on susceptibility to multiple sclerosis and influence on disease course, *Am. J. Hum. Genet.* 72 (2003) 710-716.
- [203] S.V. Ramagopalan, G. C. Deluca, A. Degenhardt, G. C. Ebers, The genetics of clinical outcome in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 201-202 (2008) 183-199.
- [204] G. Rosati, The prevalence of multiple sclerosis in the world: an update, *Neurol. Sci.* 22 (2001) 117-139.

- [205] A. Ascherio, K. L. Munger, Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part II: Noninfectious factors, *Ann. Neurol.* 61 (2007) 504-513.
- [206] M.A. Hernán, S. M. Zhang, L. Lipworth, M. J. Olek, A. Ascherio, Multiple sclerosis and age at infection with common viruses, *Epidemiology.* 12 (2001) 301-306.
- [207] S. Cepok, D. Zhou, R. Srivastava, S. Nessler, S. Stei, K. Büssow, N. Sommer, B. Hemmer, Identification of Epstein-Barr virus proteins as putative targets of the immune response in multiple sclerosis, *J. Clin. Invest.* 115 (2005) 1352-1360.
- [208] A. Ascherio, K. L. Munger, E. T. Lennette, D. Spiegelman, M. A. Hernán, M. J. Olek, S. E. Hankinson, D. J. Hunter, Epstein-Barr virus antibodies and risk of multiple sclerosis: a prospective study, *JAMA.* 286 (2001) 3083-3088.
- [209] B. Serafini, B. Rosicarelli, D. Franciotta, R. Magliozzi, R. Reynolds, P. Cinque, L. Andreoni, P. Trivedi, M. Salvetti, A. Faggioni, F. Aloisi, Dysregulated Epstein-Barr virus infection in the multiple sclerosis brain, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 2899-2912.
- [210] S.N. Willis, C. Stadelmann, S. J. Rodig, T. Caron, S. Gattenloehner, S. S. Mallozzi, J. E. Roughan, S. E. Almendinger, M. M. Blewett, W. Brück, D. A. Hafler, K. C. O'Connor, Epstein-Barr virus infection is not a characteristic feature of multiple sclerosis brain, *Brain.* 132 (2009) 3318-3328.
- [211] G. Stuart, K. S. Krikorian, A FATAL NEURO-PARALYTIC ACCIDENT OF ANTIRABIES TREATMENT, *The Lancet.* 215 (1930) 1123-1125.
- [212] G. Stuart, K. S. Krikorian, Studies in Anti-rabies Immunisation, *J. Hyg. (Lond).* 29 (1929) 1-34.
- [213] T.M. Rivers, D. H. Sprunt, G. P. Berry, OBSERVATIONS ON ATTEMPTS TO PRODUCE ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN MONKEYS, *J. Exp. Med.* 58 (1933) 39-53.
- [214] T.M. Rivers, F. F. Schwentker, ENCEPHALOMYELITIS ACCOMPANIED BY MYELIN DESTRUCTION EXPERIMENTALLY PRODUCED IN MONKEYS, *J. Exp. Med.* 61 (1935) 689-702.
- [215] F.F. Schwentker, T. M. Rivers, THE ANTIBODY RESPONSE OF RABBITS TO INJECTIONS OF EMULSIONS AND EXTRACTS OF HOMOLOGOUS BRAIN, *J. Exp. Med.* 60 (1934) 559-574.
- [216] J. FREUND, The mode of action of immunologic adjuvants, *Bibl. Tuberc.* (1956) 130-148.
- [217] H.H. Hofstetter, C. L. Shive, T. G. Forsthuber, Pertussis toxin modulates the immune response to neuroantigens injected in incomplete Freund's adjuvant: induction of Th1 cells and experimental autoimmune encephalomyelitis in the presence of high frequencies of Th2 cells, *J. Immunol.* 169 (2002) 117-125.
- [218] P.B. Silver, C. C. Chan, B. Wiggert, R. R. Caspi, The requirement for pertussis to induce EAU is strain-dependent: B10.RIII, but not B10.A mice, develop EAU and Th1 responses to IRBP without pertussis treatment, *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 40 (1999) 2898-2905.
- [219] R.R. Caspi, P. B. Silver, C. C. Chan, B. Sun, R. K. Agarwal, J. Wells, S. Oddo, Y. Fujino, F. Najafian, R. L. Wilder, Genetic susceptibility to experimental autoimmune uveoretinitis in the rat is associated with an elevated Th1 response, *J. Immunol.* 157 (1996) 2668-2675.
- [220] A. Billiau, P. Matthys, Modes of action of Freund's adjuvants in experimental models of autoimmune diseases, *J. Leukoc. Biol.* 70 (2001) 849-860.
- [221] A.P. Castro, A. P. Aguas, M. T. Silva, Adjuvant treatment increases the resistance to *Mycobacterium avium* infection of mycobacteria-susceptible BALB/c mice, *Clin. Exp. Immunol.* 92 (1993) 466-472.

- [222] A.G. Rabchevsky, J. D. Degos, P. A. Dreyfus, Peripheral injections of Freund's adjuvant in mice provoke leakage of serum proteins through the blood-brain barrier without inducing reactive gliosis, *Brain. Res.* 832 (1999) 84-96.
- [223] A. Galelli, L. Chedid, Modulation of myelopoiesis in vivo by synthetic adjuvant-active muramyl peptides: induction of colony-stimulating activity and stimulation of stem cell proliferation, *Infect. Immun.* 42 (1983) 1081-1085.
- [224] P.F. Barnes, D. Chatterjee, J. S. Abrams, S. Lu, E. Wang, M. Yamamura, P. J. Brennan, R. L. Modlin, Cytokine production induced by Mycobacterium tuberculosis lipoarabinomannan. Relationship to chemical structure, *J. Immunol.* 149 (1992) 541-547.
- [225] T.I. Roach, C. H. Barton, D. Chatterjee, J. M. Blackwell, Macrophage activation: lipoarabinomannan from avirulent and virulent strains of Mycobacterium tuberculosis differentially induces the early genes c-fos, KC, JE, and tumor necrosis factor-alpha, *J. Immunol.* 150 (1993) 1886-1896.
- [226] G.J. Weiner, The immunobiology and clinical potential of immunostimulatory CpG oligodeoxynucleotides, *J. Leukoc. Biol.* 68 (2000) 455-463.
- [227] A.K. Berstad, F. Oftung, G. E. Korsvold, I. L. Haugen, L. O. Froholm, J. Holst, B. Haneberg, Induction of antigen-specific T cell responses in human volunteers after intranasal immunization with a whole-cell pertussis vaccine, *Vaccine.* 18 (2000) 2323-2330.
- [228] C.M. Ausiello, G. Fedele, F. Urbani, R. Lande, B. Di Carlo, A. Cassone, Native and genetically inactivated pertussis toxins induce human dendritic cell maturation and synergize with lipopolysaccharide in promoting T helper type 1 responses, *J. Infect. Dis.* 186 (2002) 351-360.
- [229] M.H. Samore, G. R. Siber, Pertussis toxin enhanced IgG1 and IgE responses to primary tetanus immunization are mediated by interleukin-4 and persist during secondary responses to tetanus alone, *Vaccine.* 14 (1996) 290-297.
- [230] Z.Y. Wang, D. Yang, Q. Chen, C. A. Leifer, D. M. Segal, S. B. Su, R. R. Caspi, Z. O. Howard, J. J. Oppenheim, Induction of dendritic cell maturation by pertussis toxin and its B subunit differentially initiate Toll-like receptor 4-dependent signal transduction pathways, *Exp. Hematol.* 34 (2006) 1115-1124.
- [231] W. Hou, Y. Wu, S. Sun, M. Shi, Y. Sun, C. Yang, G. Pei, Y. Gu, C. Zhong, B. Sun, Pertussis toxin enhances Th1 responses by stimulation of dendritic cells, *J. Immunol.* 170 (2003) 1728-1736.
- [232] D.S. Linthicum, J. J. Munoz, A. Blaskett, Acute experimental autoimmune encephalomyelitis in mice. I. Adjuvant action of Bordetella pertussis is due to vasoactive amine sensitization and increased vascular permeability of the central nervous system, *Cell. Immunol.* 73 (1982) 299-310.
- [233] A. WOLF, E. A. KABAT, A. E. BEZER, The pathology of acute disseminated encephalomyelitis produced experimentally in the rhesus monkey and its resemblance to human demyelinating disease, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 6 (1947) 333-357.
- [234] R.D. ADAMS, C. S. KUBIK, The morbid anatomy of the demyelinating disease, *Am. J. Med.* 12 (1952) 510-546.
- [235] E.A. Kabat, A. Wolf, A. E. Bezer, THE RAPID PRODUCTION OF ACUTE DISSEMINATED ENCEPHALOMYELITIS IN RHESUS MONKEYS BY INJECTION OF HETEROLOGOUS AND HOMOLOGOUS BRAIN TISSUE WITH ADJUVANTS, *J. Exp. Med.* 85 (1947) 117-130.

- [236] R.H. LAATSCH, M. W. KIES, S. GORDON, E. C. ALVORD, The encephalomyelitic activity of myelin isolated by ultracentrifugation, *J. Exp. Med.* 115 (1962) 777-788.
- [237] C. Brunner, H. Lassmann, T. V. Waehneltdt, J. M. Matthieu, C. Linington, Differential ultrastructural localization of myelin basic protein, myelin/oligodendroglial glycoprotein, and 2',3'-cyclic nucleotide 3'-phosphodiesterase in the CNS of adult rats, *J. Neurochem.* 52 (1989) 296-304.
- [238] J. FOLCH, M. LEES, Proteolipides, a new type of tissue lipoproteins; their isolation from brain, *J. Biol. Chem.* 191 (1951) 807-817.
- [239] R.B. Fritz, M. J. Skeen, C. H. Chou, M. Garcia, I. K. Egorov, Major histocompatibility complex-linked control of the murine immune response to myelin basic protein, *J. Immunol.* 134 (1985) 2328-2332.
- [240] C.C. Bernard, T. G. Johns, A. Slavin, M. Ichikawa, C. Ewing, J. Liu, J. Bettadapura, Myelin oligodendrocyte glycoprotein: a novel candidate autoantigen in multiple sclerosis, *J. Mol. Med.* 75 (1997) 77-88.
- [241] R. Lebar, C. Lubetzki, C. Vincent, P. Lombrail, J. M. Boutry, The M2 autoantigen of central nervous system myelin, a glycoprotein present in oligodendrocyte membrane, *Clin. Exp. Immunol.* 66 (1986) 423-434.
- [242] R. Lebar, J. M. Boutry, C. Vincent, R. Robineaux, G. A. Voisin, Studies on autoimmune encephalomyelitis in the guinea pig. II. An in vitro investigation on the nature, properties, and specificity of the serum-demyelinating factor, *J. Immunol.* 116 (1976) 1439-1446.
- [243] V.K. Tuohy, Z. Lu, R. A. Sobel, R. A. Laursen, M. B. Lees, Identification of an encephalitogenic determinant of myelin proteolipid protein for SJL mice, *J. Immunol.* 142 (1989) 1523-1527.
- [244] J.M. Greer, M. B. Lees, Myelin proteolipid protein--the first 50 years, *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 34 (2002) 211-215.
- [245] D. Teitelbaum, M. Fridkis-Hareli, R. Arnon, M. Sela, Copolymer 1 inhibits chronic relapsing experimental allergic encephalomyelitis induced by proteolipid protein (PLP) peptides in mice and interferes with PLP-specific T cell responses, *J. Neuroimmunol.* 64 (1996) 209-217.
- [246] D. Baker, J. K. O'Neill, A. N. Davison, J. L. Turk, Control of immune-mediated disease of the central nervous system requires the use of a neuroactive agent: elucidation by the action of mitoxantrone, *Clin. Exp. Immunol.* 90 (1992) 124-128.
- [247] T.A. Yednock, C. Cannon, L. C. Fritz, F. Sanchez-Madrid, L. Steinman, N. Karin, Prevention of experimental autoimmune encephalomyelitis by antibodies against alpha 4 beta 1 integrin, *Nature.* 356 (1992) 63-66.
- [248] A. Kutzelnigg, C. F. Lucchinetti, C. Stadelmann, W. Brück, H. Rauschka, M. Bergmann, M. Schmidbauer, J. E. Parisi, H. Lassmann, Cortical demyelination and diffuse white matter injury in multiple sclerosis, *Brain.* 128 (2005) 2705-2712.
- [249] G. Raivich, R. Banati, Brain microglia and blood-derived macrophages: molecular profiles and functional roles in multiple sclerosis and animal models of autoimmune demyelinating disease, *Brain. Res. Brain. Res. Rev.* 46 (2004) 261-281.
- [250] R.N. Aravalli, P. K. Peterson, J. R. Lokensgard, Toll-like receptors in defense and damage of the central nervous system, *J. Neuroimmune. Pharmacol.* 2 (2007) 297-312.
- [251] E.D. Ponomarev, L. P. Shriver, K. Maresz, B. N. Dittel, Microglial cell activation and proliferation precedes the onset of CNS autoimmunity, *J. Neurosci. Res.* 81 (2005) 374-389.

- [252] M. Marta, A. Andersson, M. Isaksson, O. Kämpe, A. Lobell, Unexpected regulatory roles of TLR4 and TLR9 in experimental autoimmune encephalomyelitis, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 565-575.
- [253] A. Andersson, R. Covacu, D. Sunnemark, A. I. Danilov, A. Dal Bianco, M. Khademi, E. Wallström, A. Lobell, L. Brundin, H. Lassmann, R. A. Harris, Pivotal advance: HMGB1 expression in active lesions of human and experimental multiple sclerosis, *J. Leukoc. Biol.* 84 (2008) 1248-1255.
- [254] J. Bauer, T. Sminia, F. G. Wouterlood, C. D. Dijkstra, Phagocytic activity of macrophages and microglial cells during the course of acute and chronic relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neurosci. Res.* 38 (1994) 365-375.
- [255] E. Gray, T. L. Thomas, S. Betmouni, N. Scolding, S. Love, Elevated myeloperoxidase activity in white matter in multiple sclerosis, *Neurosci. Lett.* 444 (2008) 195-198.
- [256] B. Serafini, R. Magliozzi, B. Rosicarelli, R. Reynolds, T. S. Zheng, F. Aloisi, Expression of TWEAK and its receptor Fn14 in the multiple sclerosis brain: implications for inflammatory tissue injury, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67 (2008) 1137-1148.
- [257] J. Kawanokuchi, K. Shimizu, A. Nitta, K. Yamada, T. Mizuno, H. Takeuchi, A. Suzumura, Production and functions of IL-17 in microglia, *J. Neuroimmunol.* 194 (2008) 54-61.
- [258] J.M. Serot, M. C. Béné, B. Foliguet, G. C. Faure, Monocyte-derived IL-10-secreting dendritic cells in choroid plexus epithelium, *J. Neuroimmunol.* 105 (2000) 115-119.
- [259] P.G. McMenamin, Distribution and phenotype of dendritic cells and resident tissue macrophages in the dura mater, leptomeninges, and choroid plexus of the rat brain as demonstrated in wholemount preparations, *J. Comp. Neurol.* 405 (1999) 553-562.
- [260] M. Pashenkov, Y. M. Huang, V. Kostulas, M. Haglund, M. Söderström, H. Link, Two subsets of dendritic cells are present in human cerebrospinal fluid, *Brain.* 124 (2001) 480-492.
- [261] Y.M. Huang, B. G. Xiao, V. Ozenci, M. Kouwenhoven, N. Teleshova, S. Fredrikson, H. Link, Multiple sclerosis is associated with high levels of circulating dendritic cells secreting pro-inflammatory cytokines, *J. Neuroimmunol.* 99 (1999) 82-90.
- [262] R. Lande, V. Gafa, B. Serafini, E. Giacomini, A. Visconti, M. E. Remoli, M. Severa, M. Parmentier, G. Ristori, M. Salvetti, F. Aloisi, E. M. Coccia, Plasmacytoid dendritic cells in multiple sclerosis: intracerebral recruitment and impaired maturation in response to interferon-beta, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67 (2008) 388-401.
- [263] M. Vitale, M. Della Chiesa, S. Carlomagno, D. Pende, M. Aricò, L. Moretta, A. Moretta, NK-dependent DC maturation is mediated by TNFalpha and IFNgamma released upon engagement of the NKp30 triggering receptor, *Blood.* 106 (2005) 566-571.
- [264] F. Gerosa, B. Baldani-Guerra, C. Nisii, V. Marchesini, G. Carra, G. Trinchieri, Reciprocal activating interaction between natural killer cells and dendritic cells, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 327-333.
- [265] D.M. Andrews, A. A. Scalzo, W. M. Yokoyama, M. J. Smyth, M. A. Degli-Esposti, Functional interactions between dendritic cells and NK cells during viral infection, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 175-181.
- [266] F.D. Shi, L. Van Kaer, Reciprocal regulation between natural killer cells and autoreactive T cells, *Nat. Rev. Immunol.* 6 (2006) 751-760.
- [267] M. Flodström, A. Maday, D. Balakrishna, M. M. Cleary, A. Yoshimura, N. Sarvetnick, Target cell defense prevents the development of diabetes after viral infection, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 373-382.

- [268] E. Backström, B. J. Chambers, E. L. Ho, O. V. Naidenko, R. Mariotti, D. H. Fremont, W. M. Yokoyama, K. Kristensson, H. G. Ljunggren, Natural killer cell-mediated lysis of dorsal root ganglia neurons via RAE1/NKG2D interactions, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 92-100.
- [269] R.H. Morse, R. Séguin, E. L. McCrea, J. P. Antel, NK cell-mediated lysis of autologous human oligodendrocytes, *J. Neuroimmunol.* 116 (2001) 107-115.
- [270] P.J. Darlington, C. Podjaski, K. E. Horn, S. Costantino, M. Blain, P. Saikali, Z. Chen, K. A. Baker, J. Newcombe, M. Freedman, P. W. Wiseman, A. Bar-Or, T. E. Kennedy, J. P. Antel, Innate immune-mediated neuronal injury consequent to loss of astrocytes, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 67 (2008) 590-599.
- [271] J.P. Antel, E. McCrea, U. Ladiwala, Y. F. Qin, B. Becher, Non-MHC-restricted cell-mediated lysis of human oligodendrocytes in vitro: relation with CD56 expression, *J. Immunol.* 160 (1998) 1606-1611.
- [272] G. Caron, Y. Delneste, E. Roelandts, C. Duez, N. Herbault, G. Magistrelli, J. Y. Bonnefoy, J. Pestel, P. Jeannin, Histamine induces CD86 expression and chemokine production by human immature dendritic cells, *J. Immunol.* 166 (2001) 6000-6006.
- [273] S. Ebner, V. A. Nguyen, M. Forstner, Y. H. Wang, D. Wolfram, Y. J. Liu, N. Romani, Thymic stromal lymphopoietin converts human epidermal Langerhans cells into antigen-presenting cells that induce proallergic T cells, *J. Allergy. Clin. Immunol.* 119 (2007) 982-990.
- [274] H. Suto, S. Nakae, M. Kakurai, J. D. Sedgwick, M. Tsai, S. J. Galli, Mast cell-associated TNF promotes dendritic cell migration, *J. Immunol.* 176 (2006) 4102-4112.
- [275] Y. Yao, W. Li, M. H. Kaplan, C. H. Chang, Interleukin (IL)-4 inhibits IL-10 to promote IL-12 production by dendritic cells, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 1899-1903.
- [276] G. Caron, Y. Delneste, E. Roelandts, C. Duez, J. Y. Bonnefoy, J. Pestel, P. Jeannin, Histamine polarizes human dendritic cells into Th2 cell-promoting effector dendritic cells, *J. Immunol.* 167 (2001) 3682-3686.
- [277] V.H. Secor, W. E. Secor, C. A. Gutekunst, M. A. Brown, Mast cells are essential for early onset and severe disease in a murine model of multiple sclerosis, *J. Exp. Med.* 191 (2000) 813-822.
- [278] S. Nakae, H. Suto, M. Kakurai, J. D. Sedgwick, M. Tsai, S. J. Galli, Mast cells enhance T cell activation: Importance of mast cell-derived TNF, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 102 (2005) 6467-6472.
- [279] B.A. Sayed, M. A. Brown, Mast cells as modulators of T-cell responses, *Immunol. Rev.* 217 (2007) 53-64.
- [280] D. Johnson, P. A. Seelldrayers, H. L. Weiner, The role of mast cells in demyelination. 1. Myelin proteins are degraded by mast cell proteases and myelin basic protein and P2 can stimulate mast cell degranulation, *Brain. Res.* 444 (1988) 195-198.
- [281] M. El Behi, H. Zéphir, D. Lefranc, V. Dutoit, P. Dussart, P. Devos, J. P. Dessaint, P. Vermersch, L. Prin, Changes in self-reactive IgG antibody repertoire after treatment of experimental autoimmune encephalomyelitis with anti-allergic drugs, *J. Neuroimmunol.* 182 (2007) 80-88.
- [282] M.Z. Ibrahim, A. T. Reder, R. Lawand, W. Takash, S. Sallouh-Khatib, The mast cells of the multiple sclerosis brain, *J. Neuroimmunol.* 70 (1996) 131-138.
- [283] C. Lock, G. Hermans, R. Pedotti, A. Brendolan, E. Schadt, H. Garren, A. Langer-Gould, S. Strober, B. Cannella, J. Allard, P. Klonowski, A. Austin, N. Lad, N. Kaminski, S. J. Galli, J. R. Oksenberg, C. S. Raine, R. Heller, L. Steinman, Gene-microarray analysis of multiple sclerosis lesions yields new targets validated in autoimmune encephalomyelitis, *Nat. Med.* 8 (2002) 500-508.

- [284] J.J. Rozniecki, S. L. Hauser, M. Stein, R. Lincoln, T. C. Theoharides, Elevated mast cell tryptase in cerebrospinal fluid of multiple sclerosis patients, *Ann. Neurol.* 37 (1995) 63-66.
- [285] F. Petermann, V. Rothhammer, M. C. Claussen, J. D. Haas, L. R. Blanco, S. Heink, I. Prinz, B. Hemmer, V. K. Kuchroo, M. Oukka, T. Korn, $\gamma\delta$ T cells enhance autoimmunity by restraining regulatory T cell responses via an interleukin-23-dependent mechanism, *Immunity.* 33 (2010) 351-363.
- [286] K. Selmaj, C. F. Brosnan, C. S. Raine, Colocalization of lymphocytes bearing gamma delta T-cell receptor and heat shock protein hsp65+ oligodendrocytes in multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 88 (1991) 6452-6456.
- [287] R. Shimonkevitz, C. Colburn, J. A. Burnham, R. S. Murray, B. L. Kotzin, Clonal expansions of activated gamma/delta T cells in recent-onset multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 90 (1993) 923-927.
- [288] P. Stinissen, C. Vandevyver, R. Medaer, L. Vandegaer, J. Nies, L. Tuyls, D. A. Hafler, J. Raus, J. Zhang, Increased frequency of gamma delta T cells in cerebrospinal fluid and peripheral blood of patients with multiple sclerosis. Reactivity, cytotoxicity, and T cell receptor V gene rearrangements, *J. Immunol.* 154 (1995) 4883-4894.
- [289] L. Rinaldi, P. Gallo, M. Calabrese, F. Ranzato, D. Luise, D. Colavito, M. Motta, A. Guglielmo, E. Del Giudice, C. Romualdi, E. Ragazzi, A. D'Arrigo, M. Dalle Carbonare, B. Leontino, A. Leon, Longitudinal analysis of immune cell phenotypes in early stage multiple sclerosis: distinctive patterns characterize MRI-active patients, *Brain.* 129 (2006) 1993-2007.
- [290] M.S. Freedman, R. Bitar, J. P. Antel, gamma delta T-cell-human glial cell interactions. II. Relationship between heat shock protein expression and susceptibility to cytolysis, *J. Neuroimmunol.* 74 (1997) 143-148.
- [291] P. Saikali, J. P. Antel, J. Newcombe, Z. Chen, M. Freedman, M. Blain, R. Cayrol, A. Prat, J. A. Hall, N. Arbour, NKG2D-mediated cytotoxicity toward oligodendrocytes suggests a mechanism for tissue injury in multiple sclerosis, *J. Neurosci.* 27 (2007) 1220-1228.
- [292] R. Zeine, R. Pon, U. Ladiwala, J. P. Antel, L. G. Filion, M. S. Freedman, Mechanism of gammadelta T cell-induced human oligodendrocyte cytotoxicity: relevance to multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 87 (1998) 49-61.
- [293] P.Y. PATERSON, Transfer of allergic encephalomyelitis in rats by means of lymph node cells, *J. Exp. Med.* 111 (1960) 119-136.
- [294] B.M. Segal, E. M. Shevach, IL-12 unmasks latent autoimmune disease in resistant mice, *J. Exp. Med.* 184 (1996) 771-775.
- [295] S.S. Zamvil, L. Steinman, The T lymphocyte in experimental allergic encephalomyelitis, *Annu. Rev. Immunol.* 8 (1990) 579-621.
- [296] I. Gutcher, B. Becher, APC-derived cytokines and T cell polarization in autoimmune inflammation, *J. Clin. Invest.* 117 (2007) 1119-1127.
- [297] T. Olsson, Cytokines in neuroinflammatory disease: role of myelin autoreactive T cell production of interferon-gamma, *J. Neuroimmunol.* 40 (1992) 211-218.
- [298] J.E. Merrill, R. P. Zimmerman, Natural and induced cytotoxicity of oligodendrocytes by microglia is inhibitable by TGF beta, *Glia.* 4 (1991) 327-331.

- [299] W. Lin, A. Kemper, J. L. Dupree, H. P. Harding, D. Ron, B. Popko, Interferon-gamma inhibits central nervous system remyelination through a process modulated by endoplasmic reticulum stress, *Brain*. 129 (2006) 1306-1318.
- [300] E. Bettelli, B. Sullivan, S. J. Szabo, R. A. Sobel, L. H. Glimcher, V. K. Kuchroo, Loss of T-bet, but not STAT1, prevents the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Exp. Med.* 200 (2004) 79-87.
- [301] I.A. Ferber, S. Brocke, C. Taylor-Edwards, W. Ridgway, C. Dinisco, L. Steinman, D. Dalton, C. G. Fathman, Mice with a disrupted IFN-gamma gene are susceptible to the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), *J. Immunol.* 156 (1996) 5-7.
- [302] D.J. Cua, J. Sherlock, Y. Chen, C. A. Murphy, B. Joyce, B. Seymour, L. Lucian, W. To, S. Kwan, T. Churakova, S. Zurawski, M. Wiekowski, S. A. Lira, D. Gorman, R. A. Kastelein, J. D. Sedgwick, Interleukin-23 rather than interleukin-12 is the critical cytokine for autoimmune inflammation of the brain, *Nature*. 421 (2003) 744-748.
- [303] B. Becher, B. G. Durell, R. J. Noelle, Experimental autoimmune encephalitis and inflammation in the absence of interleukin-12, *J. Clin. Invest.* 110 (2002) 493-497.
- [304] T. Korn, E. Bettelli, M. Oukka, V. K. Kuchroo, IL-17 and Th17 Cells, *Annu. Rev. Immunol.* 27 (2009) 485-517.
- [305] M.J. McGeachy, Y. Chen, C. M. Tato, A. Laurence, B. Joyce-Shaikh, W. M. Blumenschein, T. K. McClanahan, J. J. O'Shea, D. J. Cua, The interleukin 23 receptor is essential for the terminal differentiation of interleukin 17-producing effector T helper cells in vivo, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 314-324.
- [306] Y. Chung, S. H. Chang, G. J. Martinez, X. O. Yang, R. Nurieva, H. S. Kang, L. Ma, S. S. Watowich, A. M. Jetten, Q. Tian, C. Dong, Critical regulation of early Th17 cell differentiation by interleukin-1 signaling, *Immunity*. 30 (2009) 576-587.
- [307] P.R. Mangan, L. E. Harrington, D. B. O'Quinn, W. S. Helms, D. C. Bullard, C. O. Elson, R. D. Hatton, S. M. Wahl, T. R. Schoeb, C. T. Weaver, Transforming growth factor-beta induces development of the T(H)17 lineage, *Nature*. 441 (2006) 231-234.
- [308] M. Veldhoen, R. J. Hocking, C. J. Atkins, R. M. Locksley, B. Stockinger, TGFbeta in the context of an inflammatory cytokine milieu supports de novo differentiation of IL-17-producing T cells, *Immunity*. 24 (2006) 179-189.
- [309] E. Bettelli, Y. Carrier, W. Gao, T. Korn, T. B. Strom, M. Oukka, H. L. Weiner, V. K. Kuchroo, Reciprocal developmental pathways for the generation of pathogenic effector TH17 and regulatory T cells, *Nature*. 441 (2006) 235-238.
- [310] C.L. Langrish, Y. Chen, W. M. Blumenschein, J. Mattson, B. Basham, J. D. Sedgwick, T. McClanahan, R. A. Kastelein, D. J. Cua, IL-23 drives a pathogenic T cell population that induces autoimmune inflammation, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 233-240.
- [311] Y. Komiyama, S. Nakae, T. Matsuki, A. Nambu, H. Ishigame, S. Kakuta, K. Sudo, Y. Iwakura, IL-17 plays an important role in the development of experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol.* 177 (2006) 566-573.
- [312] H. Kebir, I. Ifergan, J. I. Alvarez, M. Bernard, J. Poirier, N. Arbour, P. Duquette, A. Prat, Preferential recruitment of interferon-gamma-expressing T H 17 cells in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* 66 (2009) 390-402.

- [313] B. Brynedal, K. Duvefelt, G. Jonasdottir, I. M. Roos, E. Akesson, J. Palmgren, J. Hillert, HLA-A confers an HLA-DRB1 independent influence on the risk of multiple sclerosis, *Plos. One.* 2 (2007) e664.
- [314] H. Babbe, A. Roers, A. Waisman, H. Lassmann, N. Goebels, R. Hohlfeld, M. Friese, R. Schröder, M. Deckert, S. Schmidt, R. Ravid, K. Rajewsky, 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 (2000) 393-404.
- [315] F.W. Gay, T. J. Drye, G. W. Dick, M. M. Esiri, The application of multifactorial cluster analysis in the staging of plaques in early multiple sclerosis. Identification and characterization of the primary demyelinating lesion, *Brain.* 120 (Pt 8) (1997) 1461-1483.
- [316] J. Booss, M. M. Esiri, W. W. Tourtellotte, D. Y. Mason, Immunohistological analysis of T lymphocyte subsets in the central nervous system in chronic progressive multiple sclerosis, *J. Neurol. Sci.* 62 (1983) 219-232.
- [317] M.P. Crawford, S. X. Yan, S. B. Ortega, R. S. Mehta, R. E. Hewitt, D. A. Price, P. Stastny, D. C. Douek, R. A. Koup, M. K. Racke, N. J. Karandikar, High prevalence of autoreactive, neuroantigen-specific CD8+ T cells in multiple sclerosis revealed by novel flow cytometric assay, *Blood.* 103 (2004) 4222-4231.
- [318] J.V. Kim, S. S. Kang, M. L. Dustin, D. B. McGavern, Myelomonocytic cell recruitment causes fatal CNS vascular injury during acute viral meningitis, *Nature.* 457 (2009) 191-195.
- [319] J.E. Knickelbein, K. M. Khanna, M. B. Yee, C. J. Baty, P. R. Kinchington, R. L. Hendricks, Noncytotoxic lytic granule-mediated CD8+ T cell inhibition of HSV-1 reactivation from neuronal latency, *Science.* 322 (2008) 268-271.
- UNKNOWN PUBLICATION TYPE
- [321] S.M. Kaech, E. J. Wherry, Heterogeneity and cell-fate decisions in effector and memory CD8+ T cell differentiation during viral infection, *Immunity.* 27 (2007) 393-405.
- [322] J.S. Tzartos, M. A. Friese, M. J. Craner, J. Palace, J. Newcombe, M. M. Esiri, L. Fugger, 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 (2008) 146-155.
- [323] M.E. Reff, K. Carner, K. S. Chambers, P. C. Chinn, J. E. Leonard, R. Raab, R. A. Newman, N. Hanna, D. R. Anderson, Depletion of B cells in vivo by a chimeric mouse human monoclonal antibody to CD20, *Blood.* 83 (1994) 435-445.
- [324] O. Stüve, S. Cepok, B. Elias, A. Saleh, H. P. Hartung, B. Hemmer, B. C. Kieseier, Clinical stabilization and effective B-lymphocyte depletion in the cerebrospinal fluid and peripheral blood of a patient with fulminant relapsing-remitting multiple sclerosis, *Arch. Neurol.* 62 (2005) 1620-1623.
- [325] S.L. Hauser, E. Waubant, D. L. Arnold, T. Vollmer, J. Antel, R. J. Fox, A. Bar-Or, M. Panzara, N. Sarkar, S. Agarwal, A. Langer-Gould, C. H. Smith, HERMES Trial Group, B-cell depletion with rituximab in relapsing-remitting multiple sclerosis, *N. Engl. J. Med.* 358 (2008) 676-688.
- [326] R.T. Naismith, L. Piccio, J. A. Lyons, J. Lauber, N. T. Tutlam, B. J. Parks, K. Trinkaus, S. K. Song, A. H. Cross, Rituximab add-on therapy for breakthrough relapsing multiple sclerosis: a 52-week phase II trial, *Neurology.* 74 (2010) 1860-1867.
- [327] A. Lanzavecchia, Antigen-specific interaction between T and B cells, *Nature.* 314 (1985) 537-539.

- [328] R. Magliozzi, S. Columba-Cabezas, B. Serafini, F. Aloisi, Intracerebral expression of CXCL13 and BAFF is accompanied by formation of lymphoid follicle-like structures in the meninges of mice with relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neuroimmunol.* 148 (2004) 11-23.
- [329] B. Serafini, B. Rosicarelli, R. Magliozzi, E. Stigliano, F. Aloisi, Detection of ectopic B-cell follicles with germinal centers in the meninges of patients with secondary progressive multiple sclerosis, *Brain. Pathol.* 14 (2004) 164-174.
- [330] R. Magliozzi, O. Howell, A. Vora, B. Serafini, R. Nicholas, M. Puopolo, R. Reynolds, F. Aloisi, Meningeal B-cell follicles in secondary progressive multiple sclerosis associate with early onset of disease and severe cortical pathology, *Brain.* 130 (2007) 1089-1104.
- [331] A. Corcione, S. Casazza, E. Ferretti, D. Giunti, E. Zappia, A. Pistorio, C. Gambini, G. L. Mancardi, A. Uccelli, V. Pistoia, Recapitulation of B cell differentiation in the central nervous system of patients with multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 11064-11069.
- [332] J.L. Gommerman, J. L. Browning, Lymphotoxin/light, lymphoid microenvironments and autoimmune disease, *Nat. Rev. Immunol.* 3 (2003) 642-655.
- [333] C.A. Cuff, J. Schwartz, C. M. Bergman, K. S. Russell, J. R. Bender, N. H. Ruddle, Lymphotoxin alpha3 induces chemokines and adhesion molecules: insight into the role of LT alpha in inflammation and lymphoid organ development, *J. Immunol.* 161 (1998) 6853-6860.
- [334] M. Krumbholz, D. Theil, S. Cepok, B. Hemmer, P. Kivisäkk, R. M. Ransohoff, M. Hofbauer, C. Farina, T. Derfuss, C. Hartle, J. Newcombe, R. Hohlfeld, E. Meinl, Chemokines in multiple sclerosis: CXCL12 and CXCL13 up-regulation is differentially linked to CNS immune cell recruitment, *Brain.* 129 (2006) 200-211.
- [335] R.S. Klein, J. B. Rubin, Immune and nervous system CXCL12 and CXCR4: parallel roles in patterning and plasticity, *Trends. Immunol.* 25 (2004) 306-314.
- [336] M. Krumbholz, D. Theil, T. Derfuss, A. Rosenwald, F. Schrader, C. M. Monoranu, S. L. Kalled, D. M. Hess, B. Serafini, F. Aloisi, H. Wekerle, R. Hohlfeld, E. Meinl, BAFF is produced by astrocytes and up-regulated in multiple sclerosis lesions and primary central nervous system lymphoma, *J. Exp. Med.* 201 (2005) 195-200.
- [337] F. Martin, A. C. Chan, B cell immunobiology in disease: evolving concepts from the clinic, *Annu. Rev. Immunol.* 24 (2006) 467-496.
- [338] M.E. Duddy, A. Alter, A. Bar-Or, Distinct profiles of human B cell effector cytokines: a role in immune regulation? *J. Immunol.* 172 (2004) 3422-3427.
- [339] H. Link, Y. M. Huang, Oligoclonal bands in multiple sclerosis cerebrospinal fluid: an update on methodology and clinical usefulness, *J. Neuroimmunol.* 180 (2006) 17-28.
- [340] B. Obermeier, R. Mentele, J. Malotka, J. Kellermann, T. Kümpfel, H. Wekerle, F. Lottspeich, R. Hohlfeld, K. Dornmair, Matching of oligoclonal immunoglobulin transcriptomes and proteomes of cerebrospinal fluid in multiple sclerosis, *Nat. Med.* 14 (2008) 688-693.
- [341] A. Kennel De March, M. De Bouwerie, M. N. Kolopp-Sarda, G. C. Faure, M. C. Béné, C. C. Bernard, Anti-myelin oligodendrocyte glycoprotein B-cell responses in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 135 (2003) 117-125.

- [342] V. Lampasona, D. Franciotta, R. Furlan, S. Zanaboni, R. Fazio, E. Bonifacio, G. Comi, G. Martino, Similar low frequency of anti-MOG IgG and IgM in MS patients and healthy subjects, *Neurology*. 62 (2004) 2092-2094.
- [343] K.C. O'Connor, H. Appel, L. Bregoli, M. E. Call, I. Catz, J. A. Chan, N. H. Moore, K. G. Warren, S. J. Wong, D. A. Hafler, K. W. Wucherpfennig, Antibodies from inflamed central nervous system tissue recognize myelin oligodendrocyte glycoprotein, *J. Immunol*. 175 (2005) 1974-1982.
- [344] S.S. Ousman, B. H. Tomooka, J. M. van Noort, E. F. Wawrousek, K. C. O'Connor, D. A. Hafler, R. A. Sobel, W. H. Robinson, L. Steinman, Protective and therapeutic role for alphaB-crystallin in autoimmune demyelination, *Nature*. 448 (2007) 474-479.
- [345] E.K. Mathey, T. Derfuss, M. K. Storch, K. R. Williams, K. Hales, D. R. Woolley, A. Al-Hayani, S. N. Davies, M. N. Rasband, T. Olsson, A. Moldenhauer, S. Velhin, R. Hohlfeld, E. Meinl, C. Linington, Neurofascin as a novel target for autoantibody-mediated axonal injury, *J. Exp. Med*. 204 (2007) 2363-2372.
- [346] T. Derfuss, K. Parikh, S. Velhin, M. Braun, E. Mathey, M. Krumbholz, T. Kümpfel, A. Moldenhauer, C. Rader, P. Sonderegger, W. Pöllmann, C. Tiefenthaller, J. Bauer, H. Lassmann, H. Wekerle, D. Karagogeos, R. Hohlfeld, C. Linington, E. Meinl, Contactin-2/TAG-1-directed autoimmunity is identified in multiple sclerosis patients and mediates gray matter pathology in animals, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 106 (2009) 8302-8307.
- [347] G. Giovannoni, G. R. Cutter, J. Lunemann, R. Martin, C. Münz, S. Sriram, I. Steiner, M. R. Hammerschlag, C. A. Gaydos, Infectious causes of multiple sclerosis, *Lancet. Neurology*. 5 (2006) 887.
- [348] A. Ascherio, K. L. Munger, Environmental risk factors for multiple sclerosis. Part I: the role of infection, *Ann. Neurol*. 61 (2007) 288-299.
- [349] G.N. DeLorenzo, K. L. Munger, E. T. Lennette, N. Orentreich, J. H. Vogelmann, A. Ascherio, Epstein-Barr virus and multiple sclerosis: evidence of association from a prospective study with long-term follow-up, *Arch. Neurol*. 63 (2006) 839-844.
- [350] F. Aloisi, B. Serafini, R. Magliozzi, O. W. Howell, R. Reynolds, Detection of Epstein-Barr virus and B-cell follicles in the multiple sclerosis brain: what you find depends on how and where you look, *Brain*. (2010).
- [351] A. Lutterotti, R. Martin, Getting specific: monoclonal antibodies in multiple sclerosis, *Lancet. Neurol*. 7 (2008) 538-547.
- [352] B. Bielekova, B. L. Becker, Monoclonal antibodies in MS: mechanisms of action, *Neurology*. 74 Suppl 1 (2010) S31-S40.
- [353] D. Conway, J. A. Cohen, Emerging oral therapies in multiple sclerosis, *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 10 (2010) 381-388.
- [354] W. Xu, G. Fazekas, H. Hara, T. Tabira, Mechanism of natural killer (NK) cell regulatory role in experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neuroimmunol*. 163 (2005) 24-30.
- [355] R. Winkler-Pickett, H. A. Young, J. M. Cherry, J. Diehl, J. Wine, T. Back, W. E. Bere, A. T. Mason, J. R. Ortaldo, In vivo regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by NK cells: alteration of primary adaptive responses, *J. Immunol*. 180 (2008) 4495-4506.
- [356] Y. Yanagihara, K. Shiozawa, M. Takai, M. Kyogoku, S. Shiozawa, Natural killer (NK) T cells are significantly decreased in the peripheral blood of patients with rheumatoid arthritis (RA), *Clin. Exp. Immunol*. 118 (1999) 131-136.

- [357] L. Beaudoin, V. Laloux, J. Novak, B. Lucas, A. Lehuen, NKT cells inhibit the onset of diabetes by impairing the development of pathogenic T cells specific for pancreatic beta cells, *Immunity*. 17 (2002) 725-736.
- [358] M.R. Green, A. S. Kennell, M. J. Larche, M. H. Seifert, D. A. Isenberg, M. R. Salaman, Natural killer T cells in families of patients with systemic lupus erythematosus: their possible role in regulation of IGG production, *Arthritis. Rheum.* 56 (2007) 303-310.
- [359] L.F. Kastrukoff, A. Lau, R. Wee, D. Zecchini, R. White, D. W. Paty, Clinical relapses of multiple sclerosis are associated with 'novel' valleys in natural killer cell functional activity, *J. Neuroimmunol.* 145 (2003) 103-114.
- [360] B. Bielekova, M. Catalfamo, S. Reichert-Scriver, A. Packer, M. Cerna, T. A. Waldmann, H. McFarland, P. A. Henkart, R. Martin, Regulatory CD56(bright) natural killer cells mediate immunomodulatory effects of IL-2/Ralpha-targeted therapy (daclizumab) in multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 103 (2006) 5941-5946.
- [361] A.A. Vandenbark, J. Huan, M. Agotsch, D. La Tocha, S. Goelz, H. Offner, S. Lanker, D. Bourdette, Interferon-beta-1a treatment increases CD56bright natural killer cells and CD4+CD25+ Foxp3 expression in subjects with multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 215 (2009) 125-128.
- [362] Z. Illés, T. Kondo, J. Newcombe, N. Oka, T. Tabira, T. Yamamura, Differential expression of NK T cell V alpha 24J alpha Q invariant TCR chain in the lesions of multiple sclerosis and chronic inflammatory demyelinating polyneuropathy, *J. Immunol.* 164 (2000) 4375-4381.
- [363] L.T. Mars, V. Laloux, K. Goude, S. Desbois, A. Saoudi, L. Van Kaer, H. Lassmann, A. Herbelin, A. Lehuen, R. S. Liblau, Cutting edge: V alpha 14-J alpha 281 NKT cells naturally regulate experimental autoimmune encephalomyelitis in nonobese diabetic mice, *J. Immunol.* 168 (2002) 6007-6011.
- [364] A.K. Singh, M. T. Wilson, S. Hong, D. Olivares-Villagómez, C. Du, A. K. Stanic, S. Joyce, S. Sriram, Y. Koezuka, L. Van Kaer, Natural killer T cell activation protects mice against experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Exp. Med.* 194 (2001) 1801-1811.
- [365] R. Furlan, A. Bergami, D. Cantarella, E. Brambilla, M. Taniguchi, P. Dellabona, G. Casorati, G. Martino, Activation of invariant NKT cells by alphaGalCer administration protects mice from MOG35-55-induced EAE: critical roles for administration route and IFN-gamma, *Eur. J. Immunol.* 33 (2003) 1830-1838.
- [366] K.H. Sonoda, D. E. Faunce, M. Taniguchi, M. Exley, S. Balk, J. Stein-Streilein, NK T cell-derived IL-10 is essential for the differentiation of antigen-specific T regulatory cells in systemic tolerance, *J. Immunol.* 166 (2001) 42-50.
- [367] S. Kojo, K. Seino, M. Harada, H. Watarai, H. Wakao, T. Uchida, T. Nakayama, M. Taniguchi, Induction of regulatory properties in dendritic cells by Valpha14 NKT cells, *J. Immunol.* 175 (2005) 3648-3655.
- [368] M. Colonna, G. Trinchieri, Y. J. Liu, Plasmacytoid dendritic cells in immunity, *Nat. Immunol.* 5 (2004) 1219-1226.
- [369] M. Gilliet, Y. J. Liu, Generation of human CD8 T regulatory cells by CD40 ligand-activated plasmacytoid dendritic cells, *J. Exp. Med.* 195 (2002) 695-704.
- [370] M. Gilliet, Y. J. Liu, Human plasmacytoid-derived dendritic cells and the induction of T-regulatory cells, *Hum. Immunol.* 63 (2002) 1149-1155.

- [371] S.L. Bailey-Bucktrout, S. C. Caulkins, G. Goings, J. A. Fischer, A. Dzionek, S. D. Miller, Cutting edge: central nervous system plasmacytoid dendritic cells regulate the severity of relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol.* 180 (2008) 6457-6461.
- [372] E.A. Moseman, X. Liang, A. J. Dawson, A. Panoskaltis-Mortari, A. M. Krieg, Y. J. Liu, B. R. Blazar, W. Chen, Human plasmacytoid dendritic cells activated by CpG oligodeoxynucleotides induce the generation of CD4+CD25+ regulatory T cells, *J. Immunol.* 173 (2004) 4433-4442.
- [373] M.W. Taylor, G. S. Feng, Relationship between interferon-gamma, indoleamine 2,3-dioxygenase, and tryptophan catabolism, *FASEB. J.* 5 (1991) 2516-2522.
- [374] B. Baban, P. R. Chandler, M. D. Sharma, J. Pihkala, P. A. Koni, D. H. Munn, A. L. Mellor, IDO activates regulatory T cells and blocks their conversion into Th17-like T cells, *J. Immunol.* 183 (2009) 2475-2483.
- [375] W. Chen, X. Liang, A. J. Peterson, D. H. Munn, B. R. Blazar, The indoleamine 2,3-dioxygenase pathway is essential for human plasmacytoid dendritic cell-induced adaptive T regulatory cell generation, *J. Immunol.* 181 (2008) 5396-5404.
- [376] P. Terness, T. M. Bauer, L. Röse, C. Dufter, A. Watzlik, H. Simon, G. Opelz, Inhibition of allogeneic T cell proliferation by indoleamine 2,3-dioxygenase-expressing dendritic cells: mediation of suppression by tryptophan metabolites, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 447-457.
- [377] G. Frumento, R. Rotondo, M. Tonetti, G. Damonte, U. Benatti, G. B. Ferrara, Tryptophan-derived catabolites are responsible for inhibition of T and natural killer cell proliferation induced by indoleamine 2,3-dioxygenase, *J. Exp. Med.* 196 (2002) 459-468.
- [378] M. Itoh, T. Takahashi, N. Sakaguchi, Y. Kuniyasu, J. Shimizu, F. Otsuka, S. Sakaguchi, Thymus and autoimmunity: production of CD25+CD4+ naturally anergic and suppressive T cells as a key function of the thymus in maintaining immunologic self-tolerance, *J. Immunol.* 162 (1999) 5317-5326.
- [379] J.D. Fontenot, J. L. Dooley, A. G. Farr, A. Y. Rudensky, Developmental regulation of Foxp3 expression during ontogeny, *J. Exp. Med.* 202 (2005) 901-906.
- [380] A.J. Caton, C. Cozzo, J. Larkin, M. A. Lerman, A. Boesteanu, M. S. Jordan, CD4(+) CD25(+) regulatory T cell selection, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1029 (2004) 101-114.
- [381] S. Sakaguchi, N. Sakaguchi, M. Asano, M. Itoh, M. Toda, Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases, *J. Immunol.* 155 (1995) 1151-1164.
- [382] J. Reddy, Z. Illes, X. Zhang, J. Encinas, J. Pyrdol, L. Nicholson, R. A. Sobel, K. W. Wucherpfennig, V. K. Kuchroo, Myelin proteolipid protein-specific CD4+CD25+ regulatory cells mediate genetic resistance to experimental autoimmune encephalomyelitis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 101 (2004) 15434-15439.
- [383] R. Khattri, T. Cox, S. A. Yasayko, F. Ramsdell, An essential role for Scurfin in CD4+CD25+ T regulatory cells, *Nat. Immunol.* 4 (2003) 337-342.
- [384] S. Hori, T. Nomura, S. Sakaguchi, Control of regulatory T cell development by the transcription factor Foxp3, *Science.* 299 (2003) 1057-1061.
- [385] E. Gambineri, T. R. Torgerson, H. D. Ochs, Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis, *Curr. Opin. Rheumatol.* 15 (2003) 430-435.

- [386] R.S. Wildin, S. Smyk-Pearson, A. H. Filipovich, Clinical and molecular features of the immunodysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked (IPEX) syndrome, *J. Med. Genet.* 39 (2002) 537-545.
- [387] M. Miyara, Y. Yoshioka, A. Kitoh, T. Shima, K. Wing, A. Niwa, C. Parizot, C. Taflin, T. Heike, D. Valeyre, A. Mathian, T. Nakahata, T. Yamaguchi, T. Nomura, M. Ono, Z. Amoura, G. Gorochov, S. Sakaguchi, Functional delineation and differentiation dynamics of human CD4⁺ T cells expressing the FoxP3 transcription factor, *Immunity.* 30 (2009) 899-911.
- [388] T. Takahashi, T. Tagami, S. Yamazaki, T. Uede, J. Shimizu, N. Sakaguchi, T. W. Mak, S. Sakaguchi, Immunologic self-tolerance maintained by CD25(+)CD4(+) regulatory T cells constitutively expressing cytotoxic T lymphocyte-associated antigen 4, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 303-310.
- [389] K. Wing, Y. Onishi, P. Prieto-Martin, T. Yamaguchi, M. Miyara, Z. Fehervari, T. Nomura, S. Sakaguchi, CTLA-4 control over Foxp3⁺ regulatory T cell function, *Science.* 322 (2008) 271-275.
- [390] A.S. Dejean, D. R. Beisner, I. L. Ch'en, Y. M. Kerdiles, A. Babour, K. C. Arden, D. H. Castrillon, R. A. DePinho, S. M. Hedrick, Transcription factor Foxo3 controls the magnitude of T cell immune responses by modulating the function of dendritic cells, *Nat. Immunol.* 10 (2009) 504-513.
- [391] U. Grohmann, C. Orabona, F. Fallarino, C. Vacca, F. Calcinaro, A. Falorni, P. Candeloro, M. L. Belladonna, R. Bianchi, M. C. Fioretti, P. Puccetti, CTLA-4-Ig regulates tryptophan catabolism in vivo, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 1097-1101.
- [392] Y.P. Rubtsov, J. P. Rasmussen, E. Y. Chi, J. Fontenot, L. Castelli, X. Ye, P. Treuting, L. Siewe, A. Roers, W. R. Henderson, W. Muller, A. Y. Rudensky, Regulatory T cell-derived interleukin-10 limits inflammation at environmental interfaces, *Immunity.* 28 (2008) 546-558.
- [393] C.L. Maynard, L. E. Harrington, K. M. Janowski, J. R. Oliver, C. L. Zindl, A. Y. Rudensky, C. T. Weaver, Regulatory T cells expressing interleukin 10 develop from Foxp3⁺ and Foxp3⁻ precursor cells in the absence of interleukin 10, *Nat. Immunol.* 8 (2007) 931-941.
- [394] X. Cao, S. F. Cai, T. A. Fehniger, J. Song, L. I. Collins, D. R. Piwnica-Worms, T. J. Ley, Granzyme B and perforin are important for regulatory T cell-mediated suppression of tumor clearance, *Immunity.* 27 (2007) 635-646.
- [395] V. Viglietta, C. Baecher-Allan, H. L. Weiner, D. A. Hafler, Loss of functional suppression by CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells in patients with multiple sclerosis, *J. Exp. Med.* 199 (2004) 971-979.
- [396] K. Venken, N. Hellings, M. Thewissen, V. Somers, K. Hensen, J. L. Rummens, R. Medaer, R. Hupperts, P. Stinissen, Compromised CD4⁺ CD25(high) regulatory T-cell function in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis is correlated with a reduced frequency of FOXP3-positive cells and reduced FOXP3 expression at the single-cell level, *Immunology.* 123 (2008) 79-89.
- [397] J. Huan, N. Culbertson, L. Spencer, R. Bartholomew, G. G. Burrows, Y. K. Chou, D. Bourdette, S. F. Ziegler, H. Offner, A. A. Vandenbark, Decreased FOXP3 levels in multiple sclerosis patients, *J. Neurosci. Res.* 81 (2005) 45-52.
- [398] K. Venken, N. Hellings, K. Hensen, J. L. Rummens, R. Medaer, M. B. D'hooghe, B. Dubois, J. Raus, P. Stinissen, Secondary progressive in contrast to relapsing-remitting multiple sclerosis patients show a normal CD4⁺CD25⁺ regulatory T-cell function and FOXP3 expression, *J. Neurosci. Res.* 83 (2006) 1432-1446.

- [399] K. Venken, N. Hellings, T. Broekmans, K. Hensen, J. L. Rummens, P. Stinissen, Natural naive CD4+CD25+CD127low regulatory T cell (Treg) development and function are disturbed in multiple sclerosis patients: recovery of memory Treg homeostasis during disease progression, *J. Immunol.* 180 (2008) 6411-6420.
- [400] J. Haas, B. Fritzsching, P. Trübswetter, M. Korporal, L. Milkova, B. Fritz, D. Vobis, P. H. Krammer, E. Suri-Payer, B. Wildemann, Prevalence of newly generated naive regulatory T cells (Treg) is critical for Treg suppressive function and determines Treg dysfunction in multiple sclerosis, *J. Immunol.* 179 (2007) 1322-1330.
- [401] M. Thewissen, V. Somers, K. Venken, L. Linsen, P. van Paassen, P. Geusens, J. Damoiseaux, P. Stinissen, Analyses of immunosenescent markers in patients with autoimmune disease, *Clin. Immunol.* 123 (2007) 209-218.
- [402] A. Hug, M. Korporal, I. Schröder, J. Haas, K. Glatz, B. Storch-Hagenlocher, B. Wildemann, Thymic export function and T cell homeostasis in patients with relapsing remitting multiple sclerosis, *J. Immunol.* 171 (2003) 432-437.
- [403] U. Feger, C. Luther, S. Poeschel, A. Melms, E. Tolosa, H. Wiendl, Increased frequency of CD4+ CD25+ regulatory T cells in the cerebrospinal fluid but not in the blood of multiple sclerosis patients, *Clin. Exp. Immunol.* 147 (2007) 412-418.
- [404] J. Billsborough, T. C. George, A. Norment, J. L. Viney, Mucosal CD8alpha+ DC, with a plasmacytoid phenotype, induce differentiation and support function of T cells with regulatory properties, *Immunology.* 108 (2003) 481-492.
- [405] M.K. Levings, S. Gregori, E. Tresoldi, S. Cazzaniga, C. Bonini, M. G. Roncarolo, Differentiation of Tr1 cells by immature dendritic cells requires IL-10 but not CD25+CD4+ Tr cells, *Blood.* 105 (2005) 1162-1169.
- [406] K. Mahnke, E. Schmitt, L. Bonifaz, A. H. Enk, H. Jonuleit, Immature, but not inactive: the tolerogenic function of immature dendritic cells, *Immunol. Cell. Biol.* 80 (2002) 477-483.
- [407] A. Wakkach, N. Fournier, V. Brun, J. P. Breitmayer, F. Cottrez, H. Groux, Characterization of dendritic cells that induce tolerance and T regulatory 1 cell differentiation in vivo, *Immunity.* 18 (2003) 605-617.
- [408] H. Jonuleit, E. Schmitt, G. Schuler, J. Knop, A. H. Enk, Induction of interleukin 10-producing, nonproliferating CD4(+) T cells with regulatory properties by repetitive stimulation with allogeneic immature human dendritic cells, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 1213-1222.
- [409] W. Chen, W. Jin, N. Hardegen, K. J. Lei, L. Li, N. Marinos, G. McGrady, S. M. Wahl, Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3, *J. Exp. Med.* 198 (2003) 1875-1886.
- [410] I. Apostolou, H. von Boehmer, In vivo instruction of suppressor commitment in naive T cells, *J. Exp. Med.* 199 (2004) 1401-1408.
- [411] T.S. Davidson, R. J. DiPaolo, J. Andersson, E. M. Shevach, Cutting Edge: IL-2 is essential for TGF-beta-mediated induction of Foxp3+ T regulatory cells, *J. Immunol.* 178 (2007) 4022-4026.
- [412] S.G. Zheng, J. Wang, P. Wang, J. D. Gray, D. A. Horwitz, IL-2 is essential for TGF-beta to convert naive CD4+CD25- cells to CD25+Foxp3+ regulatory T cells and for expansion of these cells, *J. Immunol.* 178 (2007) 2018-2027.
- [413] I. Martinez-Foroero, R. Garcia-Munoz, S. Martinez-Pasamar, S. Inoges, A. Lopez-Diaz de Cerio, R. Palacios, J. Sepulcre, B. Moreno, Z. Gonzalez, B. Fernandez-Diez, I. Melero, M. Bendandi, P. Villoslada, IL-10

- suppressor activity and ex vivo Tr1 cell function are impaired in multiple sclerosis, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 576-586.
- [414] A.L. Astier, G. Meiffren, S. Freeman, D. A. Hafler, Alterations in CD46-mediated Tr1 regulatory T cells in patients with multiple sclerosis, *J. Clin. Invest.* 116 (2006) 3252-3257.
- [415] S.G. Zheng, J. D. Gray, K. Ohtsuka, S. Yamagiwa, D. A. Horwitz, Generation ex vivo of TGF-beta-producing regulatory T cells from CD4+CD25- precursors, *J. Immunol.* 169 (2002) 4183-4189.
- [416] H.L. Weiner, Oral tolerance: immune mechanisms and the generation of Th3-type TGF-beta-secreting regulatory cells, *Microbes. Infect.* 3 (2001) 947-954.
- [417] H.L. Weiner, Induction and mechanism of action of transforming growth factor-beta-secreting Th3 regulatory cells, *Immunol. Rev.* 182 (2001) 207-214.
- [418] L. Cosmi, F. Liotta, E. Lazzeri, M. Francalanci, R. Angeli, B. Mazzinghi, V. Santarlasci, R. Manetti, V. Vanini, P. Romagnani, E. Maggi, S. Romagnani, F. Annunziato, Human CD8+CD25+ thymocytes share phenotypic and functional features with CD4+CD25+ regulatory thymocytes, *Blood.* 102 (2003) 4107-4114.
- [419] M. Rifa'i, Z. Shi, S. Y. Zhang, Y. H. Lee, H. Shiku, K. Isobe, H. Suzuki, CD8+CD122+ regulatory T cells recognize activated T cells via conventional MHC class I-alpha/beta/TCR interaction and become IL-10-producing active regulatory cells, *Int. Immunol.* 20 (2008) 937-947.
- [420] H. Jiang, N. S. Braunstein, B. Yu, R. Winchester, L. Chess, CD8+ T cells control the TH phenotype of MBP-reactive CD4+ T cells in EAE mice, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 98 (2001) 6301-6306.
- [421] U. Feger, E. Tolosa, Y. H. Huang, A. Waschbisch, T. Biedermann, A. Melms, H. Wiendl, HLA-G expression defines a novel regulatory T-cell subset present in human peripheral blood and sites of inflammation, *Blood.* 110 (2007) 568-577.
- [422] M. Mahic, K. Henjum, S. Yaqub, B. A. Bjørnbeth, K. M. Torgersen, K. Taskén, E. M. Aandahl, Generation of highly suppressive adaptive CD8(+)/CD25(+)/FOXP3(+) regulatory T cells by continuous antigen stimulation, *Eur. J. Immunol.* 38 (2008) 640-646.
- [423] M. Suzuki, C. Konya, J. J. Goronzy, C. M. Weyand, Inhibitory CD8+ T cells in autoimmune disease, *Hum. Immunol.* 69 (2008) 781-789.
- [424] G. Filaci, M. Fravega, D. Fenoglio, M. Rizzi, S. Negrini, R. Viggiani, F. Indiveri, Non-antigen specific CD8+ T suppressor lymphocytes, *Clin. Exp. Med.* 4 (2004) 86-92.
- [425] N. Najafian, T. Chitnis, A. D. Salama, B. Zhu, C. Benou, X. Yuan, M. R. Clarkson, M. H. Sayegh, S. J. Khoury, Regulatory functions of CD8+CD28- T cells in an autoimmune disease model, *J. Clin. Invest.* 112 (2003) 1037-1048.
- [426] A. Noble, A. Giorgini, J. A. Leggat, Cytokine-induced IL-10-secreting CD8 T cells represent a phenotypically distinct suppressor T-cell lineage, *Blood.* 107 (2006) 4475-4483.
- [427] K.E. Balashov, S. J. Khoury, D. A. Hafler, H. L. Weiner, Inhibition of T cell responses by activated human CD8+ T cells is mediated by interferon-gamma and is defective in chronic progressive multiple sclerosis, *J. Clin. Invest.* 95 (1995) 2711-2719.
- [428] E. Montero, G. Nussbaum, J. F. Kaye, R. Perez, A. Lage, A. Ben-Nun, I. R. Cohen, Regulation of experimental autoimmune encephalomyelitis by CD4+, CD25+ and CD8+ T cells: analysis using depleting antibodies, *J. Autoimmun.* 23 (2004) 1-7.

- [429] H. Jiang, S. I. Zhang, B. Pernis, Role of CD8⁺ T cells in murine experimental allergic encephalomyelitis, *Science*. 256 (1992) 1213-1215.
- [430] A. Miller, O. Lider, A. B. Roberts, M. B. Sporn, H. L. Weiner, Suppressor T cells generated by oral tolerization to myelin basic protein suppress both in vitro and in vivo immune responses by the release of transforming growth factor beta after antigen-specific triggering, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 89 (1992) 421-425.
- [431] J. Correale, A. Villa, Isolation and characterization of CD8⁺ regulatory T cells in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 195 (2008) 121-134.
- [432] D.K. Tennakoon, R. S. Mehta, S. B. Ortega, V. Bhoj, M. K. Racke, N. J. Karandikar, Therapeutic induction of regulatory, cytotoxic CD8⁺ T cells in multiple sclerosis, *J. Immunol.* 176 (2006) 7119-7129.
- [433] J. Correale, A. Villa, Role of CD8⁺ CD25⁺ Foxp3⁺ regulatory T cells in multiple sclerosis, *Ann. Neurol.* 67 (2010) 625-638.
- [434] A. Morris, G. Möller, Regulation of cellular antibody synthesis effect of adoptively transferred antibody-producing spleen cells on cellular antibody synthesis, *J. Immunol.* 101 (1968) 439-445.
- [435] S.D. Wolf, B. N. Dittel, F. Hardardottir, C. A. Janeway, Experimental autoimmune encephalomyelitis induction in genetically B cell-deficient mice, *J. Exp. Med.* 184 (1996) 2271-2278.
- [436] S. Fillatreau, C. H. Sweenie, M. J. McGeachy, D. Gray, S. M. Anderton, B cells regulate autoimmunity by provision of IL-10, *Nat. Immunol.* 3 (2002) 944-950.
- [437] C.M. Sun, E. Deriaud, C. Leclerc, R. Lo-Man, Upon TLR9 signaling, CD5⁺ B cells control the IL-12-dependent Th1-priming capacity of neonatal DCs, *Immunity.* 22 (2005) 467-477.
- [438] A. O'Garra, M. Howard, IL-10 production by CD5 B cells, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 651 (1992) 182-199.
- [439] P. Lenert, R. Brummel, E. H. Field, R. F. Ashman, TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production, *J. Clin. Immunol.* 25 (2005) 29-40.
- [440] J.G. Evans, K. A. Chavez-Rueda, A. Eddaoudi, A. Meyer-Bahlburg, D. J. Rawlings, M. R. Ehrenstein, C. Mauri, Novel suppressive function of transitional 2 B cells in experimental arthritis, *J. Immunol.* 178 (2007) 7868-7878.
- [441] P.A. Blair, L. Y. Noreña, F. Flores-Borja, D. J. Rawlings, D. A. Isenberg, M. R. Ehrenstein, C. Mauri, CD19(+)CD24(hi)CD38(hi) B cells exhibit regulatory capacity in healthy individuals but are functionally impaired in systemic Lupus Erythematosus patients, *Immunity.* 32 (2010) 129-140.
- [442] T. Matsushita, K. Yanaba, J. D. Bouaziz, M. Fujimoto, T. F. Tedder, Regulatory B cells inhibit EAE initiation in mice while other B cells promote disease progression, *J. Clin. Invest.* 118 (2008) 3420-3430.
- [443] K. Yanaba, J. D. Bouaziz, K. M. Haas, J. C. Poe, M. Fujimoto, T. F. Tedder, A regulatory B cell subset with a unique CD1dhiCD5⁺ phenotype controls T cell-dependent inflammatory responses, *Immunity.* 28 (2008) 639-650.
- [444] M. Duddy, M. Niino, F. Adatia, S. Hebert, M. Freedman, H. Atkins, H. J. Kim, A. Bar-Or, Distinct effector cytokine profiles of memory and naive human B cell subsets and implication in multiple sclerosis, *J. Immunol.* 178 (2007) 6092-6099.
- [445] S. Fillatreau, D. Gray, S. M. Anderton, Not always the bad guys: B cells as regulators of autoimmune pathology, *Nat. Rev. Immunol.* 8 (2008) 391-397.

- [446] K. Yanaba, J. D. Bouaziz, T. Matsushita, T. Tsubata, T. F. Tedder, The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals, *J. Immunol.* 182 (2009) 7459-7472.
- [447] V. Moulin, F. Andris, K. Thielemans, C. Maliszewski, J. Urbain, M. Moser, B lymphocytes regulate dendritic cell (DC) function in vivo: increased interleukin 12 production by DCs from B cell-deficient mice results in T helper cell type 1 deviation, *J. Exp. Med.* 192 (2000) 475-482.
- [448] A. Mizoguchi, E. Mizoguchi, H. Takedatsu, R. S. Blumberg, A. K. Bhan, Chronic intestinal inflammatory condition generates IL-10-producing regulatory B cell subset characterized by CD1d upregulation, *Immunity.* 16 (2002) 219-230.
- [449] C. Mauri, D. Gray, N. Mushtaq, M. Londei, Prevention of arthritis by interleukin 10-producing B cells, *J. Exp. Med.* 197 (2003) 489-501.
- [450] V.V. Parekh, D. V. Prasad, P. P. Banerjee, B. N. Joshi, A. Kumar, G. C. Mishra, B cells activated by lipopolysaccharide, but not by anti-Ig and anti-CD40 antibody, induce anergy in CD8+ T cells: role of TGF-beta 1, *J. Immunol.* 170 (2003) 5897-5911.
- [451] S. Takenoshita, T. Fukushima, K. Kumamoto, M. Iwadate, The role of TGF-beta in digestive organ disease, *J. Gastroenterol.* 37 (2002) 991-999.
- [452] J. Tian, D. Zekzer, L. Hanssen, Y. Lu, A. Olcott, D. L. Kaufman, Lipopolysaccharide-activated B cells down-regulate Th1 immunity and prevent autoimmune diabetes in nonobese diabetic mice, *J. Immunol.* 167 (2001) 1081-1089.
- [453] A. Casadevall, L. A. Pirofski, Antibody-mediated regulation of cellular immunity and the inflammatory response, *Trends. Immunol.* 24 (2003) 474-478.
- [454] W. Tu, Y. L. Lau, J. Zheng, Y. Liu, P. L. Chan, H. Mao, K. Dionis, P. Schneider, D. B. Lewis, Efficient generation of human alloantigen-specific CD4+ regulatory T cells from naive precursors by CD40-activated B cells, *Blood.* 112 (2008) 2554-2562.
- [455] L.C. Chen, J. C. Delgado, P. E. Jensen, X. Chen, Direct expansion of human allospecific FoxP3+CD4+ regulatory T cells with allogeneic B cells for therapeutic application, *J. Immunol.* 183 (2009) 4094-4102.
- [456] E. Mizoguchi, A. Mizoguchi, F. I. Preffer, A. K. Bhan, Regulatory role of mature B cells in a murine model of inflammatory bowel disease, *Int. Immunol.* 12 (2000) 597-605.
- [457] M.K. Mann, K. Maresz, L. P. Shriver, Y. Tan, B. N. Dittel, B cell regulation of CD4+CD25+ T regulatory cells and IL-10 via B7 is essential for recovery from experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Immunol.* 178 (2007) 3447-3456.
- [458] X. Tai, M. Cowan, L. Feigenbaum, A. Singer, CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2, *Nat. Immunol.* 6 (2005) 152-162.
- [459] B. Salomon, D. J. Lenschow, L. Rhee, N. Ashourian, B. Singh, A. Sharpe, J. A. Bluestone, B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes, *Immunity.* 12 (2000) 431-440.
- [460] M.S. Windrem, S. J. Schanz, M. Guo, G. F. Tian, V. Washco, N. Stanwood, M. Rasband, N. S. Roy, M. Nedergaard, L. A. Havton, S. Wang, S. A. Goldman, Neonatal chimerization with human glial progenitor cells

- can both remyelinate and rescue the otherwise lethally hypomyelinated shiverer mouse, *Cell. Stem. Cell.* 2 (2008) 553-565.
- [461] S.P. Fancy, C. Zhao, R. J. Franklin, Increased expression of Nkx2.2 and Olig2 identifies reactive oligodendrocyte progenitor cells responding to demyelination in the adult CNS, *Mol. Cell. Neurosci.* 27 (2004) 247-254.
- [462] R. Patani, M. Balaratnam, A. Vora, R. Reynolds, Remyelination can be extensive in multiple sclerosis despite a long disease course, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 33 (2007) 277-287.
- [463] P. Patrikios, C. Stadelmann, A. Kutzelnigg, H. Rauschka, M. Schmidbauer, H. Laursen, P. S. Sorensen, W. Brück, C. Lucchinetti, H. Lassmann, Remyelination is extensive in a subset of multiple sclerosis patients, *Brain.* 129 (2006) 3165-3172.
- [464] C.C. Bruce, C. Zhao, R. J. Franklin, Remyelination - An effective means of neuroprotection, *Horm. Behav.* 57 (2010) 56-62.
- [465] I. Napoli, H. Neumann, Protective effects of microglia in multiple sclerosis, *Exp. Neurol.* 225 (2010) 24-28.
- [466] S. David, S. Lacroix, Molecular approaches to spinal cord repair, *Annu. Rev. Neurosci.* 26 (2003) 411-440.
- [467] L. Piccio, C. Buonsanti, M. Mariani, M. Cella, S. Gilfillan, A. H. Cross, M. Colonna, P. Panina-Bordignon, Blockade of TREM-2 exacerbates experimental autoimmune encephalomyelitis, *Eur. J. Immunol.* 37 (2007) 1290-1301.
- [468] A. Coutinho, Will the idiotypic network help to solve natural tolerance? *Trends. Immunol.* 24 (2003) 53-54.
- [469] K. Asakura, D. J. Miller, L. R. Pease, M. Rodriguez, Targeting of IgMkappa antibodies to oligodendrocytes promotes CNS remyelination, *J. Neurosci.* 18 (1998) 7700-7708.
- [470] D.J. Miller, J. J. Bright, S. Sriram, M. Rodriguez, Successful treatment of established relapsing experimental autoimmune encephalomyelitis in mice with a monoclonal natural autoantibody, *J. Neuroimmunol.* 75 (1997) 204-209.
- [471] A.E. Warrington, K. Asakura, A. J. Bieber, B. Ciric, V. Van Keulen, S. V. Kaveri, R. A. Kyle, L. R. Pease, M. Rodriguez, Human monoclonal antibodies reactive to oligodendrocytes promote remyelination in a model of multiple sclerosis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 97 (2000) 6820-6825.
- [472] B. Ciric, V. Van Keulen, M. Paz Soldan, M. Rodriguez, L. R. Pease, Antibody-mediated remyelination operates through mechanism independent of immunomodulation, *J. Neuroimmunol.* 146 (2004) 153-161.
- [473] M.M. Paz Soldán, A. E. Warrington, A. J. Bieber, B. Ciric, V. Van Keulen, L. R. Pease, M. Rodriguez, Remyelination-promoting antibodies activate distinct Ca²⁺ influx pathways in astrocytes and oligodendrocytes: relationship to the mechanism of myelin repair, *Mol. Cell. Neurosci.* 22 (2003) 14-24.
- [474] A.E. Warrington, A. J. Bieber, V. Van Keulen, B. Ciric, L. R. Pease, M. Rodriguez, Neuron-binding human monoclonal antibodies support central nervous system neurite extension, *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 63 (2004) 461-473.
- [475] D.B. McGavern, P. D. Murray, C. Rivera-Quiñones, J. D. Schmelzer, P. A. Low, M. Rodriguez, Axonal loss results in spinal cord atrophy, electrophysiological abnormalities and neurological deficits following demyelination in a chronic inflammatory model of multiple sclerosis, *Brain.* 123 Pt 3 (2000) 519-531.

- [476] D. Lefranc, L. Almeras, S. Dubucquoi, J. de Seze, P. Vermersch, L. Prin, Distortion of the self-reactive IgG antibody repertoire in multiple sclerosis as a new diagnostic tool, *J. Immunol.* 172 (2004) 669-678.
- [477] A. Lionel, J. de Seze, L. Didier, F. N. Sandrine, D. Sylvain, V. Patrick, P. Lionel, Evolution of self-reactive IgG antibody repertoires in patients with relapsing-remitting multiple sclerosis, *Immunol. Lett.* 97 (2005) 55-62.
- [478] H. Zephir, L. Almeras, M. El Behi, P. Dussart, J. de Seze, J. Steibel, E. Trifilieff, S. Dubucquoi, J. P. Dessaint, P. Vermersch, L. Prin, D. Lefranc, Diversified serum IgG response involving non-myelin CNS proteins during experimental autoimmune encephalomyelitis, *J. Neuroimmunol.* 179 (2006) 53-64.
- [479] L.K. Peterson, I. Tsunoda, R. S. Fujinami, Role of CD5+ B-1 cells in EAE pathogenesis, *Autoimmunity.* 41 (2008) 353-362.
- [480] U. Grohmann, C. Volpi, F. Fallarino, S. Bozza, R. Bianchi, C. Vacca, C. Orabona, M. L. Belladonna, E. Ayroldi, G. Nocentini, L. Boon, F. Bistoni, M. C. Fioretti, L. Romani, C. Riccardi, P. Puccetti, Reverse signaling through GITR ligand enables dexamethasone to activate IDO in allergy, *Nat. Med.* 13 (2007) 579-586.
- [481] A.L. Mellor, B. Baban, P. R. Chandler, A. Manlapat, D. J. Kahler, D. H. Munn, Cutting edge: CpG oligonucleotides induce splenic CD19+ dendritic cells to acquire potent indoleamine 2,3-dioxygenase-dependent T cell regulatory functions via IFN Type 1 signaling, *J. Immunol.* 175 (2005) 5601-5605.
- [482] T. Hayashi, L. Beck, C. Rossetto, X. Gong, O. Takikawa, K. Takabayashi, D. H. Broide, D. A. Carson, E. Raz, Inhibition of experimental asthma by indoleamine 2,3-dioxygenase, *J. Clin. Invest.* 114 (2004) 270-279.
- [483] C.H. Yang, A. Murti, L. M. Pfeffer, Interferon induces NF-kappa B-inducing kinase/tumor necrosis factor receptor-associated factor-dependent NF-kappa B activation to promote cell survival, *J. Biol. Chem.* 280 (2005) 31530-31536.
- [484] F. Fallarino, U. Grohmann, S. You, B. C. McGrath, D. R. Cavener, C. Vacca, C. Orabona, R. Bianchi, M. L. Belladonna, C. Volpi, P. Santamaria, M. C. Fioretti, P. Puccetti, The combined effects of tryptophan starvation and tryptophan catabolites down-regulate T cell receptor zeta-chain and induce a regulatory phenotype in naive T cells, *J. Immunol.* 176 (2006) 6752-6761.
- [485] P. Puccetti, U. Grohmann, IDO and regulatory T cells: a role for reverse signalling and non-canonical NF-kappaB activation, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 817-823.
- [486] T. Ito, M. Yang, Y. H. Wang, R. Lande, J. Gregorio, O. A. Perng, X. F. Qin, Y. J. Liu, M. Gilliet, Plasmacytoid dendritic cells prime IL-10-producing T regulatory cells by inducible costimulator ligand, *J. Exp. Med.* 204 (2007) 105-115.
- [487] T.A. Babcock, J. M. Carlin, Transcriptional activation of indoleamine dioxygenase by interleukin 1 and tumor necrosis factor alpha in interferon-treated epithelial cells, *Cytokine.* 12 (2000) 588-594.
- [488] B. Oxombre, M. Kouach, E. Moerman, P. Formstecher, B. Laine, The G115S mutation associated with maturity-onset diabetes of the young impairs hepatocyte nuclear factor 4alpha activities and introduces a PKA phosphorylation site in its DNA-binding domain, *Biochem. J.* 383 (2004) 573-580.
- [489] R. Brummel, P. Lenert, Activation of marginal zone B cells from lupus mice with type A(D) CpG-oligodeoxynucleotides, *J. Immunol.* 174 (2005) 2429-2434.
- [490] H. Zephir, D. Lefranc, S. Dubucquoi, J. de Seze, L. Boron, L. Prin, P. Vermersch, Serum IgG repertoire in clinically isolated syndrome predicts multiple sclerosis, *Mult. Scler.* 15 (2009) 593-600.

- [491] O. Stüve, J. L. Bennett, Pharmacological properties, toxicology and scientific rationale for the use of natalizumab (Tysabri) in inflammatory diseases, *CNS. Drug. Rev.* 13 (2007) 79-95.
- [492] M.P. Stenner, A. Waschbisch, D. Buck, S. Doerck, H. Einsele, K. V. Toyka, H. Wiendl, Effects of natalizumab treatment on Foxp3+ T regulatory cells, *Plos. One.* 3 (2008) e3319.
- [493] M. Krumbholz, I. Meinl, T. Kümpfel, R. Hohlfeld, E. Meinl, Natalizumab disproportionately increases circulating pre-B and B cells in multiple sclerosis, *Neurology.* 71 (2008) 1350-1354.
- [494] S. Sakaguchi, M. Ono, R. Setoguchi, H. Yagi, S. Hori, Z. Fehervari, J. Shimizu, T. Takahashi, T. Nomura, Foxp3+ CD25+ CD4+ natural regulatory T cells in dominant self-tolerance and autoimmune disease, *Immunol. Rev.* 212 (2006) 8-27.
- [495] P. Schneider, H. Takatsuka, A. Wilson, F. Mackay, A. Tardivel, S. Lens, T. G. Cachero, D. Finke, F. Beermann, J. Tschopp, Maturation of marginal zone and follicular B cells requires B cell activating factor of the tumor necrosis factor family and is independent of B cell maturation antigen, *J. Exp. Med.* 194 (2001) 1691-1697.
- [496] X.J. Zhu, Y. Shi, J. Z. Sun, N. N. Shan, J. Peng, C. S. Guo, P. Qin, M. Hou, High-dose dexamethasone inhibits BAFF expression in patients with immune thrombocytopenia, *J. Clin. Immunol.* 29 (2009) 603-610.
- [497] S. Walters, K. E. Webster, A. Sutherland, S. Gardam, J. Groom, D. Liuwantara, E. Mariño, J. Thaxton, A. Weinberg, F. Mackay, R. Brink, J. Sprent, S. T. Grey, Increased CD4+Foxp3+ T cells in BAFF-transgenic mice suppress T cell effector responses, *J. Immunol.* 182 (2009) 793-801.
- [498] I. Andreini, C. Getuli, V. Pacelli, R. Manno, E. Ragazzoni, A. Nunziata, P. Navarra, Function of the hypothalamo-pituitary-adrenal axis and humoral immune mechanisms during experimental allergic encephalomyelitis in SJL/J mice, *Neuroimmunomodulation.* 10 (2002) 9-16.
- [499] M. Thangarajh, A. Gomes, T. Masterman, J. Hillert, P. Hjelmsström, Expression of B-cell-activating factor of the TNF family (BAFF) and its receptors in multiple sclerosis, *J. Neuroimmunol.* 152 (2004) 183-190.
- [500] M. Krumbholz, H. Faber, F. Steinmeyer, L. A. Hoffmann, T. Kümpfel, H. Pellkofer, T. Derfuss, C. Ionescu, M. Starck, C. Hafner, R. Hohlfeld, E. Meinl, Interferon-beta increases BAFF levels in multiple sclerosis: implications for B cell autoimmunity, *Brain.* 131 (2008) 1455-1463.
- [501] K. Ley, C. Laudanna, M. I. Cybulsky, S. Nourshargh, Getting to the site of inflammation: the leukocyte adhesion cascade updated, *Nat. Rev. Immunol.* 7 (2007) 678-689.
- [502] D.H. Miller, R. I. Grossman, S. C. Reingold, H. F. McFarland, The role of magnetic resonance techniques in understanding and managing multiple sclerosis, *Brain.* 121 (Pt 1) (1998) 3-24.
- [503] S. Cepok, G. von Geldern, V. Grummel, S. Hochgesand, H. Celik, H. Hartung, B. Hemmer, Accumulation of class switched IgD-IgM- memory B cells in the cerebrospinal fluid during neuroinflammation, *J. Neuroimmunol.* 180 (2006) 33-39.
- [504] C. Lee-Chang, H. Zéphir, I. Top, S. Dubucquoi, J. Trauet, L. Prin, P. Vermersch, B-cell subsets up-regulate $\alpha 4$ integrin and accumulate in the cerebrospinal fluid in clinically isolated syndrome suggestive of multiple sclerosis onset, *Neurosci. Lett.* (2010).
- [505] K. Genç, D. L. Dona, A. T. Reder, Increased CD80(+) B cells in active multiple sclerosis and reversal by interferon beta-1b therapy, *J. Clin. Invest.* 99 (1997) 2664-2671.

[506] P.A. Calabresi, C. M. Pelfrey, L. R. Tranquill, H. Maloni, H. F. McFarland, VLA-4 expression on peripheral blood lymphocytes is downregulated after treatment of multiple sclerosis with interferon beta, *Neurology*. 49 (1997) 1111-1116.